Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Análisis de los polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción de ADN en Dichroplus elongatus y Eyprepocnemis plorans (Orthoptera) y su relación con la evolución de los cromosomas B

Clemente, Marina

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Clemente, Marina. (1999). Análisis de los polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción de ADN en Dichroplus elongatus y Eyprepocnemis plorans (Orthoptera) y su relación con la evolución de los cromosomas B. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3186_Clemente.pdf

Cita tipo Chicago:
Clemente, Marina. "Análisis de los polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción de ADN en Dichroplus elongatus y Eyprepocnemis plorans (Orthoptera) y su relación con la evolución de los cromosomas B". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3186_Clemente.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Análisis de los polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción de ADN en *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera) y su relación con la evolución de los cromosomas B

por
Marina Clemente

DIRECTOR
Dr. Juan César Vilardi

Tesis presentada para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Genética de poblaciones. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Palabras claves: cromosomas B, ADNmt, ADNr, RFLP, filogeografía, evolución, coadaptación A-B, ortópteros.

-1999-

Nº 3180

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Restriction fragment length polymorphisms of DNA analysis in *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera) and its relation with B chromosome evolution

by
Marina Clemente

DIRECTOR
Dr. Juan César Vilardi

Thesis defended to obtain the degree "Doctor en Ciencias Biológicas" (PhD)

Laboratorio de Genética de poblaciones. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Key words:B chromosome, mtDNA, rDNA, RFLP, phylogeography, evolution, A-B coadaptation, Orthoptera

-1999-

A quienes también se esforzaron para que esta tesis sea realidad

A mi esposo: Sergio

A mis padres: Estela y Horacio

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Juan C. Vilardi por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación. Por brindarme su apoyo y su buena disposición sobre todo en esta última etapa de redacción donde me he sentido muy respaldada por él.

A mi codirectora, la Dra. María Isabel Remis, por todas las horas dedicadas, por todo el empeño, el esfuerzo que ha puesto en mi trabajo y por estar a mi lado siempre que la necesité.

Al Dr. Nuno Henriques-Gil quien me recibió en su laboratorio donde me sentí sumamente integrada desde el primer día. Por poder contar con él en la corrección de la tesis que siempre se hace más difícil debido a la distancia.

Quiero agradecerle a la Dra. Beatriz Saidman por su asesoramiento y consejo así como por su confianza permitiéndome meter mano en los algarrobos colaborando en algunas de sus líneas de investigación.

A la Dra. Viviana Confalonieri por su buen humor, por alentarme en mis emprendimientos, por valorarme, por alegrarse cuando algo me sale bien.

A la Dra. Cecilia Comas por su apoyo y por su interés en mi trabajo.

A mis compañeras del 59. Gracias a: CeciB, Laura, Vero y Eimita. Sentirse a gusto en un laboratorio es lo más importante porque ahí es donde uno pasa la mayor parte del día y eso es algo que yo encontré en este laboratorio. Quiero agradecerles por todo lo compartido: lo bueno y lo malo, lo divertido y lo aburrido, las alegrías y las tristezas y por hacer del horario de la leche un culto.

A Graciela y Sara también compañeras de trabajo con las que comparto el ámbito de los escritorios. Les agradezco por su compañerismo y porque ellas también contribuyeron hacer el día de trabajo más placentero.

A Carmina Garma, amiga y compañera en el laboratorio de España, por su amistad que fue lo mejor que me traje. En lo profesional, quiero agradecerle porque gracias a ella pude terminar el trabajo que inicié y que hoy puedo incluir en esta tesis.

A mi amiga Andrea Sequeira, que hoy está lejos pero presente.

A mis padres y a mi hermano por estar presentes durante todos estos años y por vivir mi carrera con la misma intensidad con la que yo la vivo.

A mis amigos: Gustavo, Silvina, Guille, Carlitos y Lilian por los años compartidos y los que vendrán.

A Sergio Angel, mi esposo, a quien le dedico esta tesis con todo mi amor. También le agradezco a su laboratorio, el laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología del Instituto Malbrán donde desarrollamos algunas de las técnicas que no pudimos hacer en la facultad.

Al Dr. Marchant y Dr. Contreras que me enviaron espontáneamente los plásmidos que contenían las sondas utilizadas en este estudio.

Al CONICET por las becas que me fueron otorgadas permitiéndome de esa manera poder dedicarme a la investigación y crecer en mi formación científica.

A la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a la ANPCyT por el apoyo financiero en la forma de subsidios otorgados al Dr. Juan C. Vilardi y Dra. María Isabel Remis para llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad San Pablo CEU de Madrid por brindarme un lugar en el Laboratorio de Genética dirigido por el Dr. Nuno Henriques-Gil y por el apoyo financiero en la forma de subsidios para la investigación llevada a cabo en dicha universidad.

Indice

Resumen 1

Abstract 4

Capítulo I: Marcadores moleculares como herramienta para estudios evolutivos

Los ortópteros como modelos para estudios evolutivos 7

Contribución de las técnicas moleculares a la evolución 10

El ADN mitocondrial marcador de estudios poblacionales 12

El ADN ribosómico como marcador de la variación intra e interindividual 14

Polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP) 17

Capítulo II: Materiales y Métodos

Técnica de Bandeo C 19

Extracción de ADN total 20

Transformación con los clones ADN mitocondrial y ribosómicos de *Caledia captiva* 21

Extracción de ADN plasmídico 22

Digestión con enzimas de restricción 23

Corrida en geles de agarosa 24

Transferencia (Southern Blot) 25

Marcación no radioactiva 26

Hibridación y Detección 27

Análisis de los datos mitocondriales 28

Análisis de los datos ribosómicos 32

Capítulo III: Análisis de la variación y diferenciación genética en *Dichroplus elongatus*

Antecedentes de *Dichroplus elongatus*.....35

Objetivos.....39

Distribución geográfica de las poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus* analizadas.....40

Capítulo IV: Variación del ADN mitocondrial en poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus*

RESULTADOS.....44

Variación del ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus*.....44

Análisis del agrupamiento de las poblaciones de *Dichroplus elongatus* según el ADN mitocondrial.....51

Diferenciación genética entre poblaciones y provincias biogeográficas según el ADN mitocondrial.....54

DISCUSIÓN.....55

Distribución filogeográfica de los haplotipos mitocondriales en *Dichroplus elongatus*.....55

Variación para el ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus* bajo un contexto ecológico.....59

Capítulo V: Variación del ADN ribosómico en poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus*

RESULTADOS.....62

Descripción de los patrones y fragmentos ribosómicos detectados en las poblaciones analizadas de *Dichroplus elongatus*.....62

Variabilidad intra e interpoblacional para el ADN ribosómico en *Dichroplus elongatus*.....73

DISCUSION.....80

Distribución de la variación del ADN ribosómico dentro y entre poblaciones en *Dichroplus elongatus*.....81

Comparación de los resultados obtenidos con el ADN ribosómico y el ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus*.....87

Capítulo VI: Análisis de la variación del ADN mitocondrial en poblaciones naturales de *Eyprepocnemis plorans*

Antecedentes sobre *Eyprepocnemis plorans* y su complejo sistema de cromosomas B.....89

Objetivos.....95

RESULTADOS.....96

Distribución geográfica de *Eyprepocnemis plorans*.....96

Cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*.....96

ADN mitocondrial de *Eyprepocnemis plorans*.....98

Distribución del ADN mitocondrial en *Eyprepocnemis plorans*.....99

DISCUSION.....101

Cromosomas B y variación del ADN mitocondrial en *Eyprepocnemis plorans* 101

Capítulo VII: DISCUSION FINAL

Aportes de los marcadores moleculares a la distribución de la heterocromatina supernumeraria en *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans*.....104

PRINCIPALES CONCLUSIONES.....111

Bibliografía 113

Resumen

Los insectos ortópteros ofrecen excelentes oportunidades para estudiar diferentes aspectos de la genética de poblaciones, tales como la divergencia genética, flujo génico, introgresión, selección natural y adaptación.

El estudio de la evolución paralela entre ADN genómico, ADN extracromosómico (ADN mitocondrial) y cromosomas supernumerarios o B permite evaluar la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas sobre la variabilidad genética y cromosómica. Entre los insectos, *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans* constituyen excelentes modelos para este tipo de estudio ya que en poblaciones naturales de estas especies se detectaron polimorfismos para cromosomas B aparentemente estables. Sin embargo, los mecanismos de mantenimiento de estos cromosomas parece diferir entre estas especies. Mientras que en *E. plorans* el mantenimiento de los cromosomas B se apoya sobre las bases de un modelo cercano a la neutralidad, en *D. elongatus* los resultados previos sugieren un posible efecto selectivo.

D. elongatus es un saltamontes fitófago que se distribuye ampliamente en la Argentina. Las poblaciones argentinas de esta especie se caracterizan por presentar polimorfismos paralelos para cromosomas B y segmentos supernumerarios en los pares S10 (SS10), S9 (SS9) y M6 (SS6). Estudios cromosómicos previos revelaron que algunas poblaciones naturales de la provincia de Tucumán presentan polimorfismos para cromosomas B que afectan la condición de quiasmas y comprometerían la fertilidad de los portadores. Asimismo, se detectó interacción entre las distintas formas de heterocromatina. Esta interacción podría afectar los patrones de distribución de los polimorfismos con respecto a lo esperado por el azar. Estudios isoenzimáticos y citogenéticos previos demostraron que los B y dos loci alozímicos estuvieron asociados a variables geográficas o climáticas. Estas observaciones han abierto nuevos interrogantes acerca de los mecanismos de mantenimiento de las diferentes formas de heterocromatina supernumeraria en *D. elongatus* y cual es la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas sobre la diferenciación genética en esta especie.

Se analizó la variación genética de *D. elongatus* a nivel del ADN mitocondrial (ADNmt), con un enfoque filogeográfico. Mediante la técnica de RFLP (polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) se estudiaron 171 individuos provenientes de poblaciones cromosómicamente polimórficas localizadas en las regiones Noroeste y Este de Argentina pertenecientes a las provincias biogeográficas: Las Yungas, Espinal y Pampeana. Las 10 enzimas de restricción utilizadas generaron 59 fragmentos de ADNmt. Se detectaron polimorfismos para los fragmentos producidos por *Hind*III, *Hae*II y *Hinf*I. El número de substituciones por sitio entre pares de haplotipos varió entre 0.65 y 3.84%.

El fenograma obtenido por el método de Neigbor-Joining (empleando el número de sustituciones nucleotídicas por sitio) mostró dos grupos principales: uno agrupa a los haplotipos propios de la región Este y el otro agrupa a los haplotipos presentes en la región Noroeste. El árbol filogenético de consenso entre haplotipos mitocondriales permitió postular al haplotipo ancestral. Este ocupa el centro de la red y de él habrían derivado los dos grupos principales de haplotipos (Noroeste y Este).

El dendrograma de la divergencia nucleotídica entre poblaciones mostró un agrupamiento de las poblaciones de acuerdo con su distribución geográfica. El grado de heterogeneidad del ADNmt entre las poblaciones de las regiones del Noroeste y

Este fueron altamente significativo. Dentro de la región Este se observó homogeneidad entre las poblaciones pertenecientes a la provincia biogeográfica del Espinal, pero heterogeneidad entre las pertenecientes a la provincia biogeográfica Pampeana. Se observó también heterogeneidad significativa entre diferentes zonas de la provincia de Las Yungas (región Noroeste). Estos resultados sugieren que los patrones de distribución del ADNmt en *D. elongatus* podrían deberse: 1) Aislamiento por distancia entre las provincias biogeográficas y 2) Factores ecológicos dentro de las mismas.

Se estudió la variación en el ADNr en las mismas poblaciones analizadas a nivel del ADNmt de *D. elongatus* con el fin de comparar los patrones de distribución detectada a ambos niveles y evaluar las diferentes fuerzas evolutivas asociadas a la diferenciación genética detectada, incluyendo, en el caso del ADNr, la importancia relativa de la evolución concertada. Se analizaron a través de RFLP, 156 individuos de las 13 poblaciones. Se utilizó una sonda de 0.8kb del espaciador no transcripto (NTS) del saltamontes *Caledia captiva*. Se analizaron los patrones de restricción producidos por cinco enzimas (*Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Hind*III y *Xba*I) detectándose un total de 21 fragmentos. Todos ellos, excepto los de *BamH*I, mostraron variación intra e interpoblacional. *Pst*I reveló tres fragmentos cuya combinación originó cinco patrones ampliamente distribuidos. *Hind*III produjo 5 fragmentos, que originaron 10 patrones, algunos de los cuales son privados de Las Yungas. Las digestiones con *Xba*I produjeron 2 fragmentos, uno de ellos polimórfico. El mayor número de bandas y los tamaños más pequeños se produjeron al digerir el ADN con *EcoR*I donde se encontraron 9 bandas. Se analizó la variación intrapoblacional e interpoblacional a través de los índices de distancia: i) Lynch (1990), basado en la presencia y ausencia de bandas y ii) Hedrick (1983), empleando la intensidad de las bandas. Las poblaciones que presentaron mayor variabilidad intraindividual e intrapoblacional pertenecen a Las Yungas. Los árboles obtenidos por Neighbor-Joining a partir de los índices de Lynch y Hedrick son muy semejantes y evidencian dos grandes grupos. El primero de ellos reúne a la mayoría de las poblaciones de la provincia Pampeana, a las de la región sudeste de Las Yungas y una población del Espinal. El otro nuclea al resto de las poblaciones del Espinal y la población restante de la provincia Pampeana. Un rasgo interesante es la alta distancia genética entre las poblaciones de la región oeste de Las Yungas entre sí y con respecto al resto de las poblaciones.

El alto nivel de variación intraindividual, intra e interpoblacional implicaría que los mecanismos de evolución concertada serían poco eficientes en esta especie. Los patrones de distribución del ADNr no se corresponden con los hallados para el ADNmt sugiriendo que la deriva y la migración no podrían explicar por sí solas la variabilidad detectada para el ADNr, similarmente a lo encontrado para la heterocromatina supernumeraria, sugiriendo la posibilidad de que existan factores adaptativos que podrían afectar la variación de la heterocromatina supernumeraria y del ADNr limitando los efectos de los factores estocásticos.

E. plorans se distribuye a lo largo de la costa mediterránea en Europa. En el sur de España las poblaciones naturales presentan un complejo polimorfismo para cromosomas B. Se han identificado hasta cuarenta tipos de cromosomas B, los cuales no solamente se generan por recombinación sino también como consecuencia de una alta tasa de mutación. El número de tipos de B predominante en las poblaciones naturales de *E. plorans* es comparativamente bajo pero es marcado el hecho de que cada uno de ellos dominan en diferentes regiones a lo largo de la costa sur de España. Se propuso a B1 como el tipo original. A este cromosoma lo reemplazó B2 en la

provincia de Granada y este de Málaga, mientras que B5 lo hizo en la zona central de Málaga dejando una isla de B1 entre ambas áreas.

No hay razones obvias que expliquen la sustitución de un B por otro. Se propuso un modelo cíclico para la evolución de los cromosomas B de *E. plorans* que sostiene que coadaptación y evolución de genes supresores en el complemento A eliminaría el mecanismo de acumulación de los B. El sistema alcanzaría un estado cercano a la neutralidad hasta que una nueva variante recupere el mecanismo de acumulación y todo el proceso comenzaría nuevamente. Este modelo sugeriría que factores preexistentes en el genoma A podrían favorecer o no a un determinado tipo de B. Si esto es cierto, entonces debería existir alguna diferenciación genética en *E. plorans* entre las regiones donde predominan diferentes variantes de B.

En este trabajo se analizaron los patrones de restricción del ADNmt de *E. plorans* como marcador para detectar diferenciación genética entre poblaciones que difieren en el tipo de cromosoma B. Se analizaron 197 individuos provenientes de 12 poblaciones que comprenden el área en estudio.

La digestión del ADN mitocondrial de *E. plorans* con nueve enzimas de restricción reveló una baja variabilidad. Solamente *Eco*RI produjo tres patrones diferentes, denominados morfo I, II y III. En los demos del área central está presente el B1 y el morfo II del ADNmt. Al sudoeste del área central, los demos vecinos muestran una zona híbrida entre el B1 y el B5 y entre los morfos I y II. Sin embargo, el morfo I presenta una amplia distribución en el área de estudio y en algunos casos es predominante o es el único encontrado en las poblaciones donde existen otros tipos de Bs. Considerando al ADNmt como un marcador no relacionado con los Bs, deberían existir ciertas diferencias entre la distribución del ADNmt y las áreas definidas por los cromosomas B. Sin embargo, estos resultados sugieren que la evolución de los cromosomas B en *E. plorans* no sería independiente del genoma básico y que la sustitución de un B por otro podría estar acompañada en algunos demos por cambios en el complemento extracromosómico, en contraposición a lo que sucede en *D. elongatus*, donde la distribución de las variantes heterocromáticas no puede ser explicada a través de marcadores supuestamente neutros como el ADNmt.

Abstract

The orthopteran insects offer excellent opportunities to study many aspects of the population genetics, such as genetic divergence, gene flow, introgression, natural selection and adaptation.

The study of parallel evolution among nuclear DNA, extrachromosomic DNA (mitochondrial DNA) and B chromosomes allow evaluating the relative importance of the different evolutive forces on the genetic and chromosomal variability. Among insects, *Dichroplus elongatus* and *Eyprepocnemis plorans* are excellent models for these studies because stable polymorphisms for B chromosomes were detected in natural populations of these species. However, the maintenance of these chromosomes differs between these species. While in *E. plorans* the maintenance of B chromosomes is explained by a "near neutral" model, in *D. elongatus* the previous results suggest a possible selective effect.

D. elongatus is a phytophagous grasshopper widely distributed in Argentina. Some Argentinean populations exhibit parallel polymorphisms for B chromosome and supernumerary segments in chromosomes S10 (SS10), S9 (SS9) and M6 (SS6). In populations of Tucumán province, the polymorphisms for B chromosomes would affect the quiasma conditions and fertility of the carriers. Besides, an interaction among the different forms of supernumerary heterochromatin was detected. This interaction may affect the random distribution of these polymorphisms. Simultaneous isoenzymatic and citogenetic studies revealed that B's and two loci are associated with climatic and geographic variables. These results have opened new questions about the mechanisms of maintenance of the different forms of supernumerary heterochromatin and the relative importance of the different evolutive forces on the genetic differentiation in this species.

The genetic variation and phylogeography of *D. elongatus* was studied at the mitochondrial DNA (mtDNA) level. A total of 171 individuals from Northwest (Las Yungas biogeographic province) and East (Espinal and Pampeana biogeographic provinces) Argentinean populations were analyzed using restriction fragment length polymorphism (RFLP). With 10 restriction endonucleases, 59 mtDNA fragments were generated. Polymorphisms for *Hin*dIII, *Hae*III and *Hin*fI were found. The number of substitutions per site between pairs of haplotypes ranged from 0.65 to 3.84 per cent.

The Neighbor-Joining phenogram (using the number of nucleotide substitutions per site) yielded two main groups; one clusters together the private haplotypes of the East region and the other the private haplotypes of the Northwest. Phylogenetic consensus unrooted tree among mtDNA haplotypes allowed us to propose the ancestral haplotype. This haplotype occupies the central position of the network. Three groups of haplotypes would have derived from the ancestral one.

The UPGMA dendrogram from nucleotide divergence among populations showed that populations are roughly grouped according to their geographic distribution. There was a significant heterogeneity of the mtDNA distribution when populations from the East and Northwest regions were compared. In the East region, homogeneity was observed among populations from "Espinal" province, but significant differences were detected within "Pampeana" province. Heterogeneity was also observed between different borders of "Las Yungas" province (Northwest region).

The distribution patterns of mtDNA variation observed in *D. elongatus* may be explained by isolation by distance when referring to the main biogeographic provinces. In "Las Yungas" and "Pampeana" provinces ecological factors seem to have contributed to the genetic differentiation among populations.

The patterns of rDNA variation were analysed in the same natural populations of *D. elongatus*. The results were compared with those obtained from mtDNA data. The relative importance of different evolutive forces and the concerted evolution were considered to discuses the observed distribution. A total of 156 individuals from 13 populations were analyzed using RFLP. The 0.8kb cloned sequence from a 26s nontranscribed spacer (NTS) from the *Caledia captiva* rDNA was used as probe. A total of 21 restriction fragments were obtained by simple digestion with five enzymes (*BamH*I, *EcoR*I, *Pst*I, *Hind*III and *Xba*I). All the enzymes, except *Bam*HI, exhibit intra and interpopulation variation. *Pst*I revealed three restriction fragments and five patterns widely distributed. *Hind*III digestions showed five restriction fragments and 10 patterns, some of them were private of Las Yungas. *Xba*I digestions revealed two fragments, one of them polymorphic. *Eco*RI produced the greatest number of bands and the smallest fragments.

The intra and interpopulation variation was analyzed by two distance indices: i) Lynch (1990) using presence and absence of bands and ii) Hedrich (1983) using band intensities. The highest values of intraindividual and intrapopulation variability were observed in the populations of Las Yungas. Both Neighbor-Joining trees are very similar and yield two main groups: one clusters together some populations of Pampeana province, the two southeastern populations of Las Yungas and one population of Espinal. The other clusters together the remained populations of Pampeana and Espinal provinces. An interesting point is the high genetic distance between the two northwestern populations of Las Yungas and the high differentiation of both populations from the remaining ones.

The high level of intraindivual, intra and interpopulation variation would imply that the mechanisms of concerted evolution are not efficient in this species. The rDNA distribution does not agree with the mtDNA distribution, suggesting that genetic drift and migration could not explain the detected rDNA variability. Similarly to supernumerary heterochromatin, these results suggest that adaptive factors may affect the supernumerary heterochromatin and rDNA variation limiting the effects of stochastic factors.

The grasshopper *E. plorans* shows a very complex polymorphism for B chromosomes distributed along the Mediterranean coasts in the Iberian Peninsula. There are more than 40 different B chromosome described variants, which are originated not only from recombination but also from high mutation rate. The number of B types predominant in natural populations of *E. plorans* is comparatively low but it is remarkable the fact that they dominate in different regions along the southern coast of Spain. It has been proposed that the original type, B1 was replaced by B2 in the Granada province and eastern Málaga, B5 did the same in central Málaga, leaving a relict "island" of B1 between those two areas. There are no obvious reasons that explain the substitution of one B by other. A cycle model to the B chromosome evolution in *E. plorans* was proposed. Co-adaptation and suppressor genes' evolution in A chromosome neutralizes the B drive. The system would become inn a "near neutral" status until a new variant recovers the accumulation mechanism and the whole process starts over. This model implies that pre-existing factors in the genome may or may not favor a given B. If it were true, then in *E.*

plorans some genetic differentiation should exist among the regions where different B variants predominate.

We analyzed the restriction patterns of mtDNA of *E. plorans* as a marker for detecting any genetic differentiation among populations that differ in the B chromosomes. A total of 197 individuals from 12 populations that encircle the studied area were analyzed.

The digestion of the mtDNA of *E. plorans* with 9 restriction enzymes revealed a low variability as only *Eco*RI produced 3 distinguishable patterns named morphs I, II and III. The demes from the central area show the B1 type and also the morph II of mtDNA. In the southwestern neighboring demes, a hybrid zone is shown between B1 and B5 types and between morph I and II of mtDNA. However, the morph I had a wider distribution and is predominant of even the only one found in most other samples where other B's exist. Taking into account that mtDNA is a marker non-related with B's, some differences should be expected between mtDNA distribution and the B-defined areas. However, the present results suggest that the evolution of B chromosomes of *E. plorans* was not independent from the basic genome and the substitution of one B by other, in some demes, might be accompanied by changes in the mtDNA. In contrast, in *D. elongatus* neutral markers as mtDNA may not explain the distribution of heterochromatin variants.

Capítulo I:

Marcadores moleculares como herramientas para estudios evolutivos

Los ortópteros como modelos para estudios evolutivos

Las poblaciones naturales de insectos ortópteros se describieron como laboratorios naturales para realizar estudios evolutivos (Hewitt 1988) y ventanas a las que uno puede asomarse para observar procesos evolutivos (Harrison 1990). Esto se debe a que estos insectos ofrecen excelentes oportunidades para estudiar diferentes aspectos de la divergencia genética y especiación, flujo génico, introgresión, selección natural y adaptación (Vázquez *et al.* 1994).

Inicialmente, los ortópteros fueron extensamente utilizados en estudios citogenético-evolutivos debido a que poseen cromosomas de gran tamaño y en bajo número. Este hecho permite individualizar de manera inequívoca el número y ubicación de los quiasmas en las figuras diploténicas. Además, los ortópteros presentan una amplia distribución geográfica y grandes tamaños poblacionales que hacen de ellos un material muy accesible. A todo esto se suma que las generaciones son anuales de tal manera que no hay superposición de las mismas. Por todo esto los ortópteros han permitido arribar a conclusiones acerca de las relaciones filogenéticas entre las especies, analizando los cariotipos y su evolución dentro del grupo, establecer la existencia de politipismos o razas cromosómicas y también determinar la ocurrencia de polimorfismos al analizar la variabilidad intrapoblacional (Hewitt 1979, Jones y Reed 1982, John 1983, Vilardi 1988, Remis 1990, Confalonieri 1992, Clemente *et al.* 1995).

En los últimos años, gracias a la incorporación de las técnicas moleculares (secuenciación y RFLP) los ortópteros han sido ampliamente utilizados en estudios sobre filogeografía, estructura poblacional y sistemática molecular (Harrison *et al.* 1987, Chapco *et al.* 1992, Marchant y Shaw 1993, Martel y Chapco 1995,

Confalonieri *et al.* 1998). Esta nueva metodología abrió una nueva rama dentro de la biología evolutiva, la evolución molecular, y ha provisto información antes inaccesible sobre las bases moleculares de los cambios evolutivos.

El estudio de la evolución paralela entre ADN genómico, ADN extracromosómico (ADN mitocondrial) y cromosomas supernumerarios o B permite evaluar la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas sobre la variabilidad genética y cromosómica. En particular, *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae) constituyen excelentes modelos para este tipo de estudio ya que en poblaciones naturales de estas especies se detectaron polimorfismos para cromosomas B aparentemente estables. Sin embargo, los mecanismos de mantenimiento de estos cromosomas parece diferir entre estas especies. Mientras que en *E. plorans* el mantenimiento de los cromosomas B se apoya sobre las bases de un modelo cercano a la neutralidad, en *D. elongatus* los resultados previos no apoyan la hipótesis de neutralidad selectiva.

Para variantes neutras, la constelación de frecuencias alélicas y/o cromosómicas debería responder a la interacción entre deriva genética y mutación. En tales casos, la distribución de los patrones de variabilidad debería ser aleatoria a través de los diferentes ambientes. Por el contrario, las variantes con efectos selectivos, benéficos o perjudiciales, podrían presentar patrones no aleatorios que reflejarían diferencias en los constreñimientos selectivos entre distintas poblaciones.

Los polimorfismos para fragmentos de ADN (evaluados mediante la técnica de RFLP) se suelen considerar esencialmente neutros, especialmente en el caso del ADN mitocondrial (ADNmt). Por lo tanto, las relaciones fenéticas entre las poblaciones obtenidas a partir de los mismos podrían representar las relaciones esperadas entre las poblaciones en ausencia de efectos selectivos. Por ello, un

análisis comparativo de la variabilidad citogenética y molecular en diversas población puede proveer indicios sobre los mecanismos de mantenimiento de los cromosomas B y las fuerzas evolutivas que rigen su mantenimiento en dichas poblaciones.

Contribución de las técnicas moleculares a la evolución

En los últimos años, la biología a desarrollado una serie de técnicas que se han convertido en herramientas útiles para otras disciplinas. Así, la utilización de datos moleculares (variación a nivel de proteínas y secuencias de ADN) ha enriquecido ampliamente los estudios sobre etología, ecología, sistemática y paleontología. Aunque la biología molecular no es la panacea para ninguna de estas disciplinas, muchos problemas considerados infranqueables para los morfólogos pudieron ser abordados por los sistemáticos moleculares (Hillis 1987, Patterson 1987). Tomando en cuenta el balance entre la información que brindan y el costo del uso de técnicas moleculares, el interés de la evolución molecular debería centrarse en dos áreas (Avise 1994):

1) Caracterización de la variación molecular en sistemas controvertidos. En este punto podrían centrarse las dos especies analizadas en el presente trabajo: *D. elongatus* y *E. plorans*, las cuales presentan polimorfismos para variantes heterocromáticas cuyo mecanismo de mantenimiento en las poblaciones se encuentra bajo discusión.
2) Aplicación de los datos genéticos para la construcción de filogenias entre especies o taxones superiores que no pudieran resolverse con las observaciones tradicionales.

Una vez elegido el grupo o grupos de organismos que se va a estudiar, debe establecerse a qué nivel van a evaluarse las relaciones dentro y entre los grupos. Estas abarcan desde un nivel microevolutivo hasta uno macroevolutivo (Avise 1994):

a) identidad genética versus no-identidad
b) parentesco (filiación)

c) grado de endogamia dentro de un grupo local o población

d) diferenciación entre poblaciones geográficas o subespecies

e) diferenciación entre especies aisladas reproductivamente

f) estructura filogenética en taxones superiores

Por lo tanto, los marcadores moleculares pueden proveer información genética útil para concluir sobre un problema biológico particular a diferentes niveles jerárquicos.

El ADN mitocondrial como marcador de estudios poblacionales

Las poblaciones naturales que habitan diferentes localidades geográficas exhiben cierto grado de diferenciación genética simplemente porque los individuos que están espacialmente más cercanos tienden a aparearse con más frecuencia entre sí que con los individuos más alejados geográficamente (Turner *et al.* 1982). Sin embargo, diversos factores tales como flujo génico, deriva genética, varios modos de selección natural, divergencia mutacional y oportunidad de recombinación genética pueden afectar la divergencia, reduciendo o generando diferenciación adicional entre las poblaciones. Asimismo, factores históricos y ecológicos pueden influir sobre la estructura poblacional (Avise 1994).

La introducción del estudio de la molécula de ADN mitocondrial (ADNmt) ha contribuido al análisis de la estructura poblacional y la diferenciación entre especies, aportando nuevos elementos a los estudios históricos y filogenéticos. En consecuencia, el ADNmt fue extensamente usado para determinar relaciones sistemáticas entre especies (Kessler y Avise 1984), para diferenciar taxones morfológicamente similares (Avise y Nelson 1984) y para analizar la estructura poblacional y filogeografía (Harrison *et al.* 1987, Chapco *et al.* 1992, Rossi *et al.* 1996, Confalonieri *et al.* 1998). Aunque existen algunas excepciones (Lunt y Hyman 1997, Lunt *et al.* 1998a, Wallis 1999), las propiedades de herencia por vía materna, falta de recombinación y presencia de una alta tasa de evolución han provisto una molécula con múltiples alelos o haplotipos que pueden ser ordenados filogenéticamente dentro de una especie. De tal modo, los linajes mitocondriales reflejan la dinámica histórica y pueden ser localizados geográficamente.

Tales observaciones introdujeron la palabra filogeografía que se refiere al estudio de los principios y los procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos a nivel intraespecíficos (Avise *et al.* 1987). En general, las diferencias en la movilidad del organismo así como la fragmentación ambiental parecen tener importantes influencias sobre los patrones filogeográficos del ADNmt.

El ADN ribosómico como marcador de la variación intra e interindividual

El ADN ribosómico (ADNr) presenta ciertas características que lo convierten en un atractivo marcador para establecer relaciones fenéticas y filogenéticas. El ADNr en el genoma de eucariontes se presenta como cientos de copias repetidas en tándem de la unidad transcripcional y el espaciador no-transcripto que pueden presentarse en el mismo y/o en diferentes cromosomas (Fig. 1). Dos espaciadores internos que se transcriben (ITS-1 e ITS-2) separan a los genes 18S, 5S y 28S (o sus homólogos). El espaciador transcripto externo (ETS) se localiza río arriba del gen 18S. Las copias adyacentes de la unidad repetida de ADNr están separadas por el espaciador que no se transcribe (NTS) también llamado espaciador intergénico. Esta región contiene elementos subrepetidos que actuarían como potenciadores de la transcripción (enhancers), así como sitios de unión a la polimerasa que regularían la transcripción del ADNr (Hillis y Dixon 1991). Por lo tanto, los NTS podrían ser de gran importancia en la expresión génica (Rogers y Bendich 1987, Echeverría *et al.* 1994).

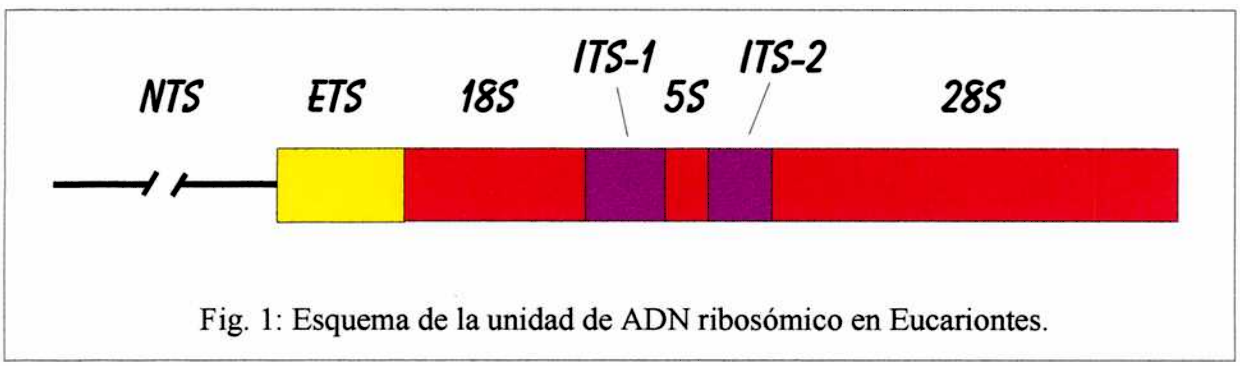

Fig. 1: Esquema de la unidad de ADN ribosómico en Eucariontes.

Las subunidades más pequeñas de los genes ribosómicos (16-18S) son las que evolucionan más lentamente. Las subunidades mayores (23-28S) presentan una tasa de evolución mayor, mientras que las regiones espaciadoras tienen una tasa evolutiva aún más alta y permiten inferir filogenias entre taxones cercanamente relacionadas (Hillis y Dixon 1991). Dentro de estas regiones los NTS son los que evolucionan más rápidamente por tal motivo han sido extensamente utilizados para evaluar la diferenciación dentro y entre poblaciones (Learn y Schaal 1987, King y Schaal 1989, Black *et al.* 1989).

Cuando los estudios sobre el ADNr se desarrollaron más detalladamente, se llegó a la conclusión de que las múltiples copias de los genes ribosómicos no evolucionan independientemente (Dover 1982, Arnheim 1983). Cada copia de ADNr es generalmente muy similar a otras copias dentro de un individuo y hasta dentro de una especie. Por lo tanto, la baja variación entre las unidades de ADNr dentro de los individuos indica que las múltiples copias son homogéneas tanto entre cromosomas homólogos como no homólogos a través de un proceso de homogeneización que fue llamado evolución concertada (Arnheim *et al.* 1980). A pesar del mismo, dentro de un individuo pueden acumularse rápidamente diferencias entre unidades ribosómicas consistentes mayoritariamente en variaciones en la longitud de las subunidades dentro de los NTS (Arnheim *et al.* 1982, Williams *et al.* 1988).

Los procesos más importantes que aparentan ser responsables de la evolución concertada son el entrecruzamiento desigual y la conversión génica. Sin embargo, la contribución relativa de estos dos mecanismos está aún bajo discusión (Dover 1982, Seperak *et al.* 1988, Hillis *et al.* 1991). Independientemente de cual de estos mecanismos tenga más peso sobre la evolución concertada, cabe destacar el hecho que este fenómeno tiene efectos altamente relevantes sobre el análisis intraespecífico.

En general, en diferentes especies de plantas e insectos, la variabilidad intraespecífica en el NTS se genera por diferencias en el número de subrepeticiones, las cuales abarcan un tamaño desde 100 pb hasta 300 pb (Coen *et al.* 1982, Polanco y Peréz de la Vega 1997). Por otro lado, la variabilidad en el NTS se relacionó con características de importancia biológica y/o económicas, tales como la tasa de desarrollo en *Drosophila* (Cluster *et al.* 1987) o la producción de granos en maíz (Rocheford *et al.* 1990).

Por lo tanto, el estudio de la variación en los NTS puede resultar sumamente interesante para evaluar la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas sobre la diferenciación poblacional y sus efectos sobre la evolución concertada.

Polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP)

El descubrimiento de las enzimas de restricción (Linn y Arber 1968, Meselson y Yuan 1968) revolucionó la biología molecular. Las endonucleasas de tipo II (Kessler 1987) cortan secuencias específicas de ADN doble cadena de cuatro, cinco o seis pares de bases de longitud. Dentro de los usos que se le ha dado a las enzimas de restricción se encuentra el estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP). Todos los análisis de RFLP involucran el corte del ADN con varias endonucleasas, separando los fragmentos resultantes de acuerdo con su peso molecular mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa o poliacrilamida. Las diferencias en el patrón de bandas puede deberse a sustituciones de bases dentro del sitio de reconocimiento de la enzima, adiciones o deleciones de ADN o rearreglos en la secuencia.

El análisis de los patrones de restricción del ADNmt en animales suele aplicarse a estudios poblacionales intraespecíficos y a especies relacionadas (Chapco *et al.* 1994, Randi *et al.* 1995, Seutin *et al.* 1995, Apostolidis *et al.* 1996 y Zink 1996). Los patrones de restricción del ADNmt se reflejan en el perfil de fragmentos producidos por cada enzima. Debido a que el ADNmt es una molécula circular, el número de fragmentos lineales es igual al número de sitios de restricción reconocidos por las endonucleasas. Sin embargo, a diferencia de los sitios, no todos los cambios en los fragmentos son independientes. Por lo tanto, es conveniente, siempre que sea posible, basar el análisis en sitios diferentes, más que en fragmentos.

Cuando el análisis de los patrones de restricción involucra el uso de sondas de secuencias de ADN repetidas, la sonda hibrida con secuencias que presentan cambios

en los fragmentos de restricción de familias multigénicas, tal es el caso del ADNr. Estudios por RFLP utilizando sondas ribosómicas permitieron distinguir entre especies cercanas y poblaciones coespecíficas (Wilson *et al.* 1984, Williams *et al.* 1985, Suzuki *et al.* 1986). La diferenciación genética, generalmente, incluye variaciones en el largo de la unidad repetida debido a la heterogeneidad en el tamaño de las regiones espaciadoras, con variación adicional por cambios en los sitios de restricción en los segmentos codificantes y nocodificantes (Dover 1982, Hillis *et al.* 1991). Un factor que debe ser tomado en cuenta al momento de utilizar familias multigénicas como marcadores moleculares se relaciona con los mecanismos de evolución concertada que podría llevar a la homogeneización de las secuencias de ADN repetidas. El grado de homogeneidad que pueden alcanzar estas secuencias es de dificultosa interpretación (Drove 1982). Pese a esta complicación, los RFLP utilizando el ADNr y en particular el espaciador NTS como marcador de la variación intraespecífica ha contribuido al estudio de estructura geográfica poblacional y patrones de introgresión en zonas híbridas (Arnold *et al.* 1987, Learn y Schaal 1987).

Capítulo II:
Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

La composición de las soluciones utilizadas se describen en la página 34.

Técnica de bandeo C

1) Fijar testículos y ovariolas en alcohol absoluto: ácido acético glacial (3:1).
2) Realizar las preparaciones por aplastado con ácido acético glacial 45%.
3) Saltar el cubre con N_2 líquido.
4) Incubar las preparaciones en alcohol absoluto durante una noche.
5) Secar
6) Incuabar las preparaciones en ácido clorídrico 0.2 N durante 1 minuto a 60° C.
7) Lavar
8) Incubar en hidróxido de bario ($Ba(OH)_2$) saturado durante 12 minutos a temperatura ambiente.
9) Lavar
10) Incubar en SSC 2X durante 1 hora a 60° C.
11) Teñir con GIEMSA
12) Lavar y secar
13) Visualizar las bandas C en microscopio óptico

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN total de saltamontes adultos (machos y hembras) utilizando la técnica de Marchant (1988) que se describe a continuación:

1) Machacar el insecto hasta obtener un polvo fino en un mortero con aires líquido (o bien N_2 líquido).
2) Permitir que el aire se evapore y pasar el polvo a un tubo limpio agregándole 5 ml de Solución A.
3) Incubar esta suspención a 37° C durante un período de 1 a 3 horas.
4) Extraer con 3 ml de fenol equilibrado.
5) Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar el ADN con 2 volúmenes de perclorato de sodio, agitar por inversión y guardar durante una hora a –20° C.
6) Pasar el ADN a un tubo eppendorf.
7) Lavar con etanol 70%.
8) Secar.
9) Resuspender en agua destilada estéril.

Luego de remover el ARN usando RNAsa A se realizó una segunda purificación del ADN con fenol seguida de otra con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Luego se precipitan y lavan los ácidos nucleicos obtenidos. Las concentraciones de las extracciones fueron estimadas a partir de la visualización del ADN en geles de agarosa con Bromuro de Etidio (BrEt).

Transformación con los clones ADN mitocondrial y ribosómicos de *Caledia captiva*

Se disponía de tres plásmidos pUC 18 que contenían tres insertos de diferentes tamaños: 3; 5 y 8kb que representan la totalidad del genoma mitocondrial completo de *Caledia captiva* (gentilmente cedidos por el Dr. Adam Marchant). Por otro lado se disponía de un plásmido pGEM que contenía una secuencia de 0.8kb del espaciador no transcripto (NTS) del ADN ribosómico de *Caledia captiva* (gentilmente cedido por el Dr. N. Contreras, ver Arnold *et al.* 1987).

Previo a la transformación de las bacterias con los plásmidos se procedió a hacerlas competentes usando Cloruro de Calcio para luego transformarlas mediante TRATAMIENTO TERMICO.

La transformación de las bacterias se realizó de acuerdo al protocolo que se describe a continuación (Maniatis *et al.* 1982):

1) Incubar las células en hielo durante 30 minutos.
2) Tratamiento térmico durante 2 minutos a 42° C y luego pasar a hielo durante 1 minutos.
3) Añadir 2 ml de medio LB y agitar durante 1 hora a 37° C.
4) Plaquear las células en placas con LB más ampicilina (LBA) incubando toda la noche a 37°C.

Como el plásmido contiene el gen de resistencia a ampicilina todas las bacterias que crezcan contendrán el plásmido.

Extracción del ADN plasmídico

Previo a la mini-prep se picaron las colonias y se pasaron a erlenmeyers con 10 ml de medio LBA. Se dejaron crecer toda la noche a 37° C con agitación. Al día siguiente se procede a la extracción del ADN plasmídico según se describe a continuación (Maniatis *et al.* 1982):

1) Centrifugar en dos eppendorf hasta completar 5 ml de cultivo por eppendorf.
2) Resuspender en 200 µl de Solución I más una punta de espátula de Lisozima.
3) Incubar 10 minutos a Temperatura ambiente.
4) Agregar 400 µl de Solución II.
5) Incubar 5 minutos en hielo.
6) Agregar 300 µl de Solución III y agitar por inversión.
7) Centrifugar 15 minutos a 13000 r.p.m.
8) Pasar 800 µl del sobrenadante a un tubo limpio y agregar 600 µl de isopropanol.
9) Centrifugar 15 minutos a 13000 r.p.m.
10) Lavar con Etanol 80 %, secar y resuspender con TE.
11) Tratar con RNAsa
12) Extraer el ADN plasmídico una vez con fenol y otra con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
13) Precipitar el ADN con solución III y dos volúmenes y medio de etanol absoluto.
14) Incubar a –20° C durante 30 minutos.
15) Centrifugar 15 minutos a 13000 r.p.m.
16) Lavar con etanol 80%, secar y resuspender con agua destilada estéril.

Digestión del ADN con enzimas de restricción

Se utilizaron 10 enzimas de restricción (Promega) que reconocen secuencias de cuatro (*Alu*I, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I y *Mbo*I) y seis (*Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Ksp*I, *Pst*I, *Sac*I, *Xba*I y *Xbo*I) pares de bases.

En un tubo eppendorf se agregan los reactivos en el siguiente orden:

- ADN 10 µl (aprox. 1 µg/µl).
- Tampón de la enzima (10X) 5 µl.
- Suero de albúmina bovina (BSA) (10 mg/ml) 5µl.
- Enzima 1U/µl 1µl.
- Agua hasta 50 µl.

Las reacciones se realizaron en un baño térmico a 37° C durante toda la noche.

Corrida en geles de agarosa del ADN previamente digerido

El ADN digerido se corrió en geles de agarosa entre el 0.7 y el 1% en tampón TAE 1X pH 8 durante cinco horas. Simultáneamente se sembró fago lambda digerido con *Hind*III-*Eco*RI (Promega) como marcador de peso molecular.

Transferencia (Southern Blot)

El ADN digerido se transfirió de los geles a una membrana de nylon (GeneScreen) de acuerdo al método de Southern (1975):

1) Colocar el gel en solución desnaturalizante durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación.
2) Descartar la solución desnaturalizante, agregar solución neutralizante e incubar durante 20 minutos.
3) Repetir el paso 2.
4) Montar el sistema de transferencia. En una fuente colocar solución SSC 10X. Sobre un soporte de acrílico colocar dos tiras de papel watman 2MM que deberán estar en contacto con la solución SSC10X.
5) Tomar el gel y colocarlo sobre el papel watman. Quitar las burbujas.
6) Mojar la membrana previamente cortada del tamaño del gel en solución neutralizante y colocarla sobre el gel. Quitar las burbujas.
7) Colocar sobre la membrana dos papeles watman previamente humedecidos en solución neutralizante. Quitar las burbujas.
8) Colocar un taco de aproximadamente 3 cm de papel absorbente seco sobre el sistema con un peso de aproximadamente 1 kilo.
9) Dejar toda la noche.
10) Desmontar y humedecer la membrana en solución SSC 2X.
11) Dejar secar y fijar el ADN a la membrana en un transiluminador UV durante 2 minutos.

Marcación no radioactiva de las sondas

Luego de digerir los plásmidos con la enzima de restricción correspondiente (*Sac*I para el ADNmt y *Pst*I-*Eco*RI para el ADNr) y correrlos en un gel de agarosa se procedió a la purificación de los fragmentos de interés utilizando el kit Qiaquick Gel siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Una vez purificados los fragmentos se procedió a la marcación de los mismos siguiendo las instrucciones de los fabricantes utilizando el kit DIG DNA labelling (Boehringer Mannheim) que incorpora los nucleótidos marcados con digoxigenina mediante el método de "random priming" utilizando primers al azar para unirse al ADN templado. La marca se incorpora mediante la enzima Klenow.

La mezcla de reacción contiene:

- ADN desnaturalizado a 100° C 10 minutos (10 ng-3 μg)
- Mezcla de hexanucleotidos (10X) 2 μl
- Mezcla de dNTP marcados (10X) 2 μl
- Tampón de la enzima (10X) 2 μl
- Klenow 1 μl
- H2O hasta 20 μl

Incubar la mezcla de reacción durante toda la noche en un baño a 37° C. Luego guardar a –20° C hasta el momento de utilizarla.

Hibridación y Detección

Las hibridaciones se realizaron en un horno de hibridación siguiendo las instrucciones de Manniatis *et al.* (1982) según se describen abajo:

1) Introducir la membrana en un tubo de hibridación y colocar 20 ml de solución de pre-hibridación.
2) Incubar durante 2 horas a 55° C (temperatura de hibridación).
3) Descartar la solución de pre-hibridación y agregar 10 ml solución de hibridación que contiene la sonda (5 ng- 25ng/ml) previamente desnaturalizada.
4) Dejar toda la noche.
5) Proceder a los lavados: a) SSC 2X: SDS 0.1%.
   b) SSC 1X: SDS 0.1%
   c) SSC 0.5X: SDS 0.1%

Cada lavado se realizó durante 15 minutos a 55° C.

6) Pasar la membrana a una cuba lavar con Tampón I e incubar durante media hora a temperatura ambiente con Tampón II.
7) Descartar, lavar con Tampón I e incubar con solución de anticuerpo anti-DIG (Boehringer Mannheim) durante media hora a temperatura ambiente.
8) Descartar y lavar dos veces durante 15 minutos con Tampón I.
9) Añadir 20 ml de solución de color (Boehringer Mannheim).
10) Conservar en oscuridad hasta que se visualizan las bandas.

Análisis de los datos mitocondriales

La inferencia de los sitios involucrados en cada patrón detectado se hizo a partir de la digestión total y parcial del ADN.

El número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre haplotipos (^p) se estimó empleando el método iterativo de Nei y Tajima (1983):

$$\hat{p} = \hat{p}_1 \frac{\Sigma r_i (\hat{m}_i - mxy_i / [(1 - (1 - \hat{p}_1)^{r_i}) (2 - (1 - \hat{p}_1)^{r_i})]}{\Sigma r_i \hat{m}_i / [2 - (1 - \hat{p}_1)^{r_i}]}$$

i refiere a los i tipos de enzimas con r_i nucleótidos de reconocimiento.

$\hat{p}_1 = 1 - S^{1/r}$, donde $S = (1 - p)^r$,

donde p es la probabilidad de que las secuencias x e y tengan diferentes nucléotidos en una determinada posición y r es el número de nucleótidos que reconoce la enzima i dada.

^mi es el número promedio de sitios de restricción para la enzima i estimado como:

^mi = (mx + my)/2, donde mx y my son el número de sitios de restrición para las secuencia x e y.

mxy_i es el número de sitios de restricción compartidos entre las secuencias x e y para la enzima i.

La diversidad haplotípica dentro de las poblaciones se estimó de acuerdo al método de Nei y Tajima (1981) como se describe a continuación:

$$h = \frac{2n}{2n - 1} (1 - \Sigma x_i^2)$$

x_i = frecuencia del alelo i en la población x

n = número de individuos analizados

La diversidad nucleotídica dentro de las poblaciones se calculó siguiendo el método de Nei y Tajima (1981):

$$dx = \frac{nx}{nx - 1} \Sigma\, xi\, xj\, dij$$

nx = número de secuencias muestreadas

xi = frecuencia del haplotipo i en la población x

xj = frecuencia del haplotipo j en la población x

dij = número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre haplotipos i y j

donde dij = - log Sij/r, siendo Sij = 2mij/ mi + mj

r = número de nucleótidos que reconoce la enzima

mij = número de sitios compartidos entre las secuencias i y j

mi y mj = número de sitios de la secuencia i y j, respectivamente

La diversidad (dxy) y la divergencia (d_A) nucleotídica entre poblaciones se estimaron de acuerdo con Nei 1987 utilizando el programa "DA" contenido en el paquete de programas REAP (McElroy *et al.* 1991).

$$dxy = \Sigma\, xi\, yj\, dij$$

que mide el número de sustituciones promedio entre el haplotipo i de la población x y el haplotipo j en la población y.

dij es el número de sustituciones nucleotídicas entre el haplotipo i de la población x y el haplotipo j de la población y.

El número neto de sustituciones nucleotídicas entre dos poblaciones se estima a partir de:

$$d_A = dxy - \frac{(dx + dy)}{2}$$

La construcción de los árboles filogenéticos entre haplotipos se basó en la presencia o ausencia de los sitios de restricción involucrados en cada haplotipo

utilizando los siguientes programas contenidos en el paquete de programas PHYLIP (Felsenstein 1992):

1. El programa MIX donde se obtuvieron 51 árboles igualmente parsimoniosos. La opción Wagner utilizada en este análisis permite cambios de 0 a 1 y de 1 a 0. Las premisas de este método son:
    - El estado ancestral es desconocido.
    - Los diferentes caracteres evolucionan independientemente
    - Los diferentes linajes evolucionan independientemente
    - Los cambios de 0 a 1 o de 1 a 0 tienen igual probabilidad
    - Un mismo sitio no puede perderse y/o ganarse
    - La tasa de evolución en diferentes linajes es suficientemente bajo de tal manera que dos cambios en un segmento largo es menos probable que un cambio en un segmento corto.
2. El programa Consense origina un árbol consenso basado en los cladogramas de mínima longitud. Básicamente el árbol de consenso consiste de grupos monofiléticos que se presenten con la mayor frecuencia posible en el conjunto de datos. Si el grupo se presenta en todos (estricto) o en más del 50% (mayoría) de los árboles será incluido en el cladograma de consenso.

El análisis de agrupamiento entre los haplotipos empleando el número promedio de sustituciones nucleotídica por sitio entre haplotipos se desarrolló utilizando la opción Neighbor-Joining del programa Neighbor contenido en el PHYLIP (Felsenstein 1992). El Neighbor-Joining es un método que permite la contrucción de árboles a partir de datos de distancia genéticas. El principio de este método es agrupar linajes vecinos minimizando el largo total de las ramas.

El dendograma basado en la diversidad nucleotídica (dA) entre poblaciones se desarrolló utilizando el método de agrupamiento de apares que usa las medias no ponderadas (UPGMA) empleando el programa Statistica (Statistica Statsoft Inc. 1993). En este método la distancia entre dos grupos es calculada como la distancia promedio entre todos los pares de linajes.

La correspondencia entre las distancias geográficas y genéticas fue realizada a través del test de Mantel (Mantel 1967) usando el programa NTSYS.

La heterogeneidad geográfica de los haplotipos mitocondriales se midió a través de la simulación de Monte Carlo como lo describen Roff y Bentzen (1989) usando el programa MONTE contenido en el paquete REAP (McElroy *et al.* 1991). El grado de heterogeneidad (ensayado a través de un análisis de χ^2) se basa en comparar los datos de la matriz original con los datos estimados a partir de repetidas aleatorizaciones de dicha matriz. El nivel de significación se obtuvo sobre la base de las 10000 aleatorizaciones producidas. Para cada comparación, el χ^2_0 es la heterogeneidad observada y χ^2_r representa la heterogeneidad esperada para cada aleatorizaciones. De acuerdo con este método el nivel de significancia fue estimado como:

n/N donde

n es el número de aleatorizaciones que genera $\chi^2_r > \chi^2_0$

N es el número total de aleatorizaciones.

Análisis de los datos ribosómicos

Se compararon los fragmentos de restricción de los individuos analizados dentro y entre poblaciones utilizando los índices de similitud de Hedrick (1983) y Lynch (1990).

1) Indice de Similitud de Hedrick

Para este análisis se midió la intensidad de las bandas presentes utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation 1998). Este programa permite analizar corridas en geles de una dimensión midiendo la intensidad de la banda en densidades ópticas. Los valores obtenidos fueron agrupados en 7 categorías y codificados como 111111, 111110, 111100, 111000, 110000 ó 100000 y la ausencia de banda se codificó como 000000.

Una vez obtenidos los datos se procedió al cálculo del índice de similitud como sigue:

$$Sxy = \frac{2\,S'xy}{Sx + Sy}$$

Donde Sxy es la similitud entre las poblaciones x e y corregida por la similitud intrapoblacional.

$Sx = \Sigma x_i^2$

$Sy = \Sigma y_i^2$

Donde x_i e yi son las frecuencias del genotipo i en las poblaciones x e y, respectivamente.

$S'xy = \Sigma x_i y_i$, donde x_i e y_i son las frecuencias del genotipo i en las poblaciones x e y, respectivamente.

La distancia genética (Dij_h) de Hedrick entre poblaciones se calculó como:

Dij = 1- Sxy.

2) Indice de Similitud de Lynch

Para este análisis se evaluó la presencia y ausencia de los fragmentos de restricción para los patrones detectados en todos los individuos analizados.

La similitud (Si) dentro de las poblaciones se calculó como el promedio de los Sxy.

Donde, $Sxy = \frac{2nxy}{nx + ny}$

nxy = número de fragmentos compartidos entre los individuos x e y

nx = número de fragmentos totales en el individuo x

ny = número de fragmentos totales en el individuo y

La similitud promedio entre las poblaciones corregida por la similitud dentro de las poblaciones se estimó como:

Sij = 1 + S'ij – [(Si + Sj)/2]

Donde Si es la similitud promedio de los individuos dentro de la población i y S'ij es la similitud promedio de todos los pares de individuos entre las poblaciones i y j.

Mientras que los valores de disimilitud (Dij_l) de Lynch entre poblaciones se estimaron como 1- Sij.

Los dendrogramas construidos a partir de las distancias genéticas de Hedrick y Lynch se obtuvieron utilizando la opción Neighbor-Joining del programa Neighbor contenido en el PHYLIP (Felsenstein 1992).

La dependencia del número de bandas ribosómicas y variables geográficas (latitud, longitud y altitud) se evaluó mediante el análisis de regresión múltiple utilizando el método de selección por pasos (stepwise selection procedure) que permite el control de la entrada de variables al modelo.

Composición de las soluciones utilizadas

SOLUCIONES	COMPOSICION
Solución A	8 partes de 0.05M Tris-HCL, 0.1 M NaCl, 0.1 M EDTA; 1 parte de 5% SDS y 1 parte de 2mg/ml Proteinasa K
Fenol equilibrado	Solución de 10mM Tris-HCl pH: 7.5 y 10mM EDTA
Perclorato de sodio	2.9 M en etanol 80%
RNAsa A	Concentración: 100µg/ ml de agua destilada
SSC 20X	3 M NaCl 300 mM citrato de sodio, pH: 7
Medio LB	Para 1 litro: bacto-triptona 10 gr, extracto de levadura 5 gr, NaCl 10gr, pH: 7
Ampicilina	Concentración: 50mg/ml de agua destilada
Solución I	5 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH: 8 y 10 mM EDTA
Solución II	0.2 N NaOH y 1 %SDS
Solución III	Acetato de sodio 3M pH: 5.2
TE	10 mM Tris-HCl pH: 8 y 1 mM EDTA
TAE 50X	Para 1 litro: Tris, ácido acético, EDTA
Solución desnaturalizante	0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl
Solución neutralizante	0.5M Tris-HCl pH 7.5, 3 M NaCl
Solución de pre-hibridación	Agente bloqueante 0.5%, SSC 5X, N-lauroyl-sarcosina 0.1%, SDS 0.02%
Tampón I	100 mM Tris-HCl ph 7.5, 150 mM NaCl
Tampón II	Agente bloqueante 0.5% disuelto en Tampón I
Tampón III	100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50 mM MgCl
Solución de anticuerpo	4 µl de anticuerpo anti-DIG en 20 ml de tampón I
Solución colorimética	20 ml tampón III, 90 µl NBT y 70 µl X-fosfato

Capítulo III:

Análisis de la variación y diferenciación genética en *Dichroplus elongatus*

Antecedentes de *Dichroplus elongatus*

El género *Dichroplus* pertenece a los acrídidos y abarca más de 40 especies descriptas (Sáez y Perez-Mosquera 1971). Estas especies son habitantes conspicuos de sabanas y praderas en las llanuras abiertas, interiores y de montañas de la región Neotropical. Además de su gran potencial biótico poseen una notable capacidad de expansión, atributos que las hacen plagas de gran importancia económica para la Argentina (Ronderos 1985).

Dichroplus elongatus, un saltamontes ampliamente distribuido en nuestro país, se ha descripto como causante de graves daños a las cosechas, ya que se alimenta de una amplia variedad de pasturas y cultivos (Libermann 1944, Zapata 1987). De hecho, en 1995, seis localidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires fueron declaradas en emergencia debido a los daños causados a los cultivos por diversas especies de ortópteros, siendo la especie más abundante *D. elongatus* (Cigliano *et al.* 1995). En general, un componente fundamental de un exitoso control de las especies-plaga es la apreciación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones blanco (Chapco *et al.* 1992). Sin embargo, pese a su importancia económica, poco se conoce sobre su estructura poblacional. Por lo tanto, el conocimiento de la cantidad y distribución de la variabilidad genética en *D. elongatus* podría proveer una perspectiva evolutiva para comprender los factores que la colocan en categoría de plaga.

Sin embargo, el mayor interés que ha despertado *D. elongatus* es desde el punto de vista evolutivo debido a los polimorfismos paralelos para cromosomas B y segmentos numerarios detectados en poblaciones naturales abriendo ciertos interrogantes acerca de los mecanismos de mantenimiento de los cromosomas B en

particular y la heterocromatina supernumeraria en general y cual es la importancia relativa de las diferentes fuerzas evolutivas sobre la diferenciación cromosómica en esta especie.

i. Estudios cromosómicos en *D. elongatus*

Los primeros estudios citogenéticos en poblaciones naturales que se realizaron en esta especie describieron interesantes polimorfismos paralelos para cromosomas B y segmentos supernumerarios en poblaciones del Noroeste argentino. En la población de Raco (provincia de Tucumán) se observó que la frecuencia de quiasmas totales no difiere entre individuos portadores y no portadores de cromosomas B. Sin embargo, se observó un efecto de dosis de los Bs sobre la frecuencia de quiasmas intersticiales, que aumenta con el número de B por célula (Vilardi 1985, Remis y Vilardi 1986). En las poblaciones de Raco y Tafí Viejo (provincia de Tucumán) la frecuencia de los cromosomas B no varió entre años ni entre poblaciones sugiriendo estabilidad de dichos polimorfismos en estas poblaciones (Clemente *et al.* 1994). En la población de Tafí Viejo se detectaron diferencias significativas entre los distintos cariomorfos de heterocromatina supernumeraria para la frecuencia de quiasmas intersticiales y por ende sobre la recombinación genética. Además, se evidenció un efecto de dosis de los Bs sobre la frecuencia de quiasmas intersticiales similar al encontrado en la población de Raco. En cuanto al efecto de los cromosomas B sobre la fertilidad, se ha observado en ambas poblaciones, que los individuos portadores de Bs presentaban una mayor frecuencia de espermátidas anormales que los no portadores (Loray *et al.* 1991, Clemente *et al.* 1994). Por lo tanto, los estudios citogenéticos poblacionales evidenciaron un marcado efecto de los Bs sobre la fertilidad y la

recombinación genética de los portadores, sugiriendo que la heterocromatina no sería selectivamente neutra.

Recientemente, nuevos estudios citogenéticos en poblaciones del noroeste y este de la Argentina mostraron que las distintas formas de heterocromatina no serían independientes entre sí, de modo que la presencia de una variante heterocromática limitaría las fluctuaciones al azar de otras variantes heterocromáticas correlacionadas. La interacción entre estas formas de heterocromatina podría afectar los patrones de distribución esperados por el azar y podrían considerarse como un factor adicional involucrado en los patrones detectados en *D. elongatus* (Remis *et al.* 1998).

ii. Estudios moleculares en *D. elongatus*

La incorporación de técnicas isoenzimáticas permitió realizar estudios citogenéticos y alozímicos simultáneos sobre poblaciones de las provincias de Tucumán y Buenos Aires (Sequeira *et al.* 1995, 1997). Estos han demostrado una asociación significativa entre la frecuencia de Bs y dos loci isoenzimáticos (AAT y PEP) con respecto a variables climáticas o geográficas. Por otro lado, al evaluar los datos alozímicos a través de los estadísticos F de Wright (1965), se observó una tendencia hacia un exceso de homocigotas dentro de las poblaciones, como se esperaría en poblaciones subestructuradas. El fenograma construido a partir de los datos isoenzimáticos no se vincula con lo esperado por las distancias geográficas debido a que la matriz de distancias geográficas no está correlacionada con las distancias genéticas. La estimación del flujo génico reveló que éste sería suficientemente elevado como para enmascarar las diferencias en las frecuencias alélicas si éstas fueran originadas solamente por deriva genética. Este resultado

podría vincularse con el patrón de variación clinal hallado para los dos loci isoenzimáticos mencionados (Sequeira *et al.* 1995, 1997).

Simultáneamente, se evaluó la variabilidad genética a través de marcadores de ADN amplificados al azar de individuos provenientes de las mismas poblaciones analizadas isoenzimáticamente. La variabilidad intrapoblacional obtenida mediante RAPDs no difiere significativamente de la obtenida mediante isoenzimas. Con respecto a la diferenciación interpoblacional el valor de Fst calculado a partir de RAPDs es mucho mayor que el calculado a partir de datos alozímicos. El análisis mediante la técnica de RAPD mostró una mayor correlación entre las distancias genéticas y geográficas, como se esperaría para marcadores neutros (Sequeira 1996).

Objetivos

- Analizar los patrones de variación moleculares en poblaciones naturales de *D. elongatus* a nivel del ADN mitocondrial.
- Realizar estudios filogeográficos analizando los patrones de distribución biogeográfica de los haplotipos mitocondriales.
- Analizar los patrones de variación molecular en las mismas poblaciones a nivel del ADN ribosómico.
- Estimar para cada tipo de marcador molecular, la variabilidad intrapoblacional y diferenciación interpoblacional estableciendo las relaciones genéticas entre las poblaciones.
- Analizar de manera conjunta la variabilidad del ADN ribosómico y mitocondrial brindando información acerca de la evolución paralela de los distintos tipos de ADN y compararlos con los resultados obtenidos para heterocromatina supernumeraria.
- Comparar las agrupaciones obtenidas empleando marcadores moleculares y cromosómicos, analizando la importancia relativa de la migración y la deriva genética en la diferenciación intraespecífica poblacional en *D. elongatus*.

Distribución geográfica de las poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus* analizadas

Se analizaron un total de 327 individuos pertenecientes a 13 poblaciones de *D. elongatus* que habitan tres provincias biogeográficas de la Argentina (Fig. 2) (Ver Cabrera y Willink 1980 para una descripción de las características de las provincias biogeográficas).

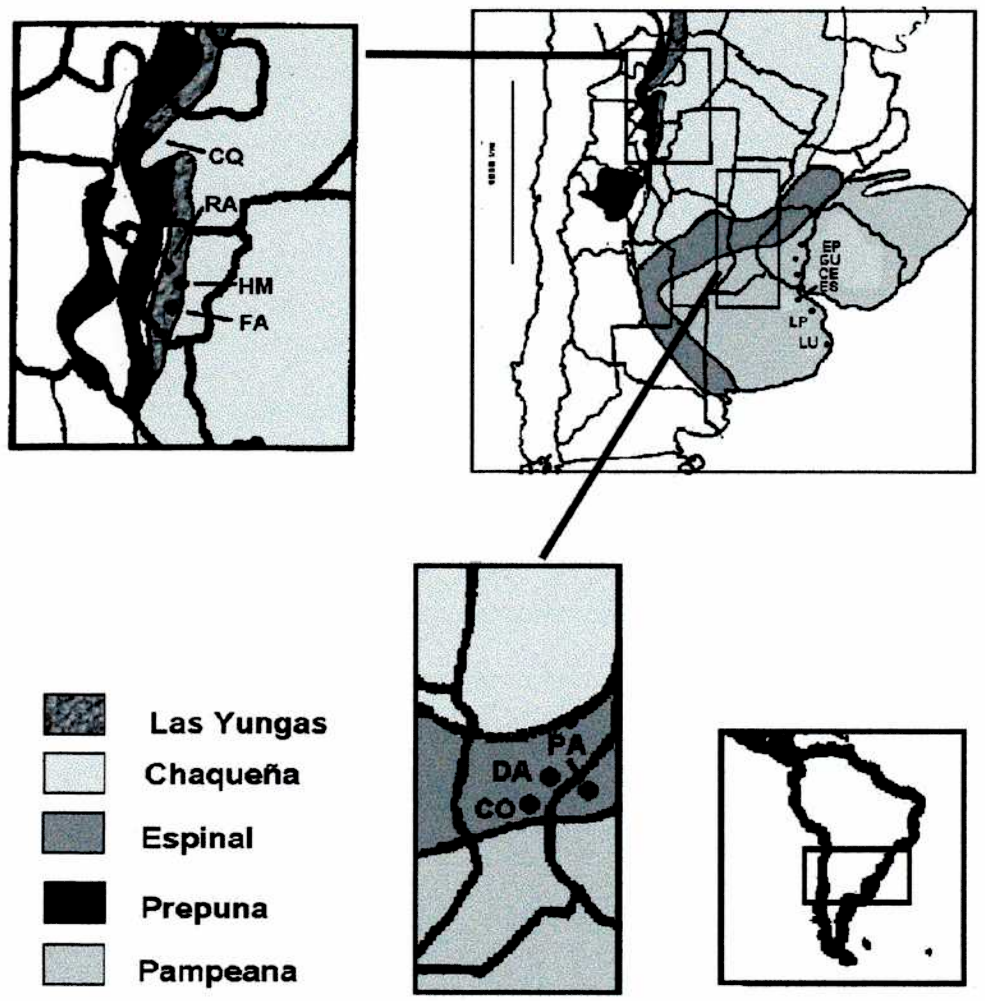

Fig. 2: Localización geográfica de las poblaciones analizadas. CQ: Campo Quijano, RA: Raco, FA: Famailla, HM: Horco Molle, CO: Coronda, DA: Desvío Arijón, PA: Paraná, EP: El Palmar, GU: Gualeguaychú, CE: Ceibas, ES: Escobar, LP: La Plata, LU: La Lucila.

Las poblaciones de Raco (RA), Horco Molle (HM), Famailla (FA) y Campo Quijano (CQ) se localizan en la provincia biogeográfica de Las Yungas. Ésta se extiende por las laderas orientales de los Andes, formando una angosta franja desde Venezuela hasta el noroeste de la Argentina. En su extremo norte está separada de la provincia Amazónica por los llanos de Venezuela y Colombia y en su extremo sur limita al este con la provincia Chaqueña, pero en su mayor parte limita con la provincia Amazónica, con la que es muy afín. El clima en este territorio es menos caluroso que el de las provincias colindantes hacia el este y muy húmedo a causa de las abundantes precipitaciones y las neblinas que cubren continuamente las montañas en la época lluviosa. Altitudinalmente esta provincia se extiende entre los 500 y 3500 metros de altura. La vegetación predominante es la selva nublada.

HM y FA están localizadas en el extremo sudeste de Las Yungas, vecino a la provincia Chaqueña. La alta humedad y temperatura caracterizan esta área. RA y CQ se ubican sobre el extremo oeste cerca del límite con la provincia de la Prepuna. Estas poblaciones se encuentran por encima de los mil metros de altura, donde la temperatura y la humedad son mucho menores comparadas con el otro extremo (Fig. 2, Tabla 1).

Las poblaciones de Ceibas (CE), El Palmar (EP), Gualeguaychú (GU), Escobar (ES), La Plata (LP) y La Lucila (LU) se localizan en la provincia biogeográfica Pampeana. Esta provincia ocupa las llanuras en el este de la Argentina, Uruguay y la mitad austral del estado de Río Grande do Sul, en Brasil. Abarca una región llana o ligeramente ondulada, con algunas montañas de poca altura (hasta 1200 metros). Tiene un clima templado-cálido, con lluvias distribuidas a lo largo de todo el año. La vegetación dominante es la estepa o seudoestepa de gramíneas. CE, EP y GU se localizan cerca del río Uruguay en el distrito Uruguayensis. Este distrito posee

elementos típicos de selva ribereña. La población de ES se encuentra sobre el río Paraná pero comparte los componentes climáticos y vegetales que las poblaciones anteriores lo que permite incluirla dentro de este distrito. LP y LU pertenecen al distrito Oriental que muestra una pobre incidencia de elementos tropicales (Fig. 2, Tabla 1).

Tabla 1: Localización geográfica de las poblaciones analizadas.

Regiones Geográficas	Provincias Biogeográficas	Distrito	Poblaciones
Noroeste	"Las Yungas"	Extremo Noroeste	Campo Quijano
			Raco
		Extremo Sudoeste	Horco Molle
			Famailla
Este	"Espinal"	———	Coronda
			Parana
			Desvío Arijón
	"Pampeana"	Oriental	La Plata
			La Lucila
		Uruguayensis	Ceibas
			Gualeguaichú
			El Palmar
			Escobar

Las poblaciones de Paraná (PA), Desvío Arijón (DA) y Coronda (CO) se localizan en la provincia biogeográfica del Espinal. Esta provincia se extiende por la Argentina a manera de un arco irregular desde el centro de Corrientes y norte de Entre Ríos, por el Centro de Santa Fe y Córdoba hasta el sur de Buenos Aires. El clima es cálido y húmedo en la porción norte y templado y seco en el sur. La vegetación predominante es el bosque xerófilo, bastante parecido al de la provincia

Chaqueña, pero más bajo y pobre. Las tres poblaciones se localizan en la parte más caliente y húmeda de esta provincia donde la casi totalidad de los terrenos está destinado a la agricultura (Fig. 2, Tabla 1).

Capítulo IV:

Variación del ADN mitocondrial en poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus*

RESULTADOS

Variación del ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus*

A partir de las digestiones con un total de 10 endonucleasas se obtuvieron 59 fragmentos en los 171 individuos utilizados para este estudio. Se observó un único haplotipo para cada individuo indicando la ausencia de heteroplasmia en las muestras analizadas (Tabla 2, Fig. 3).

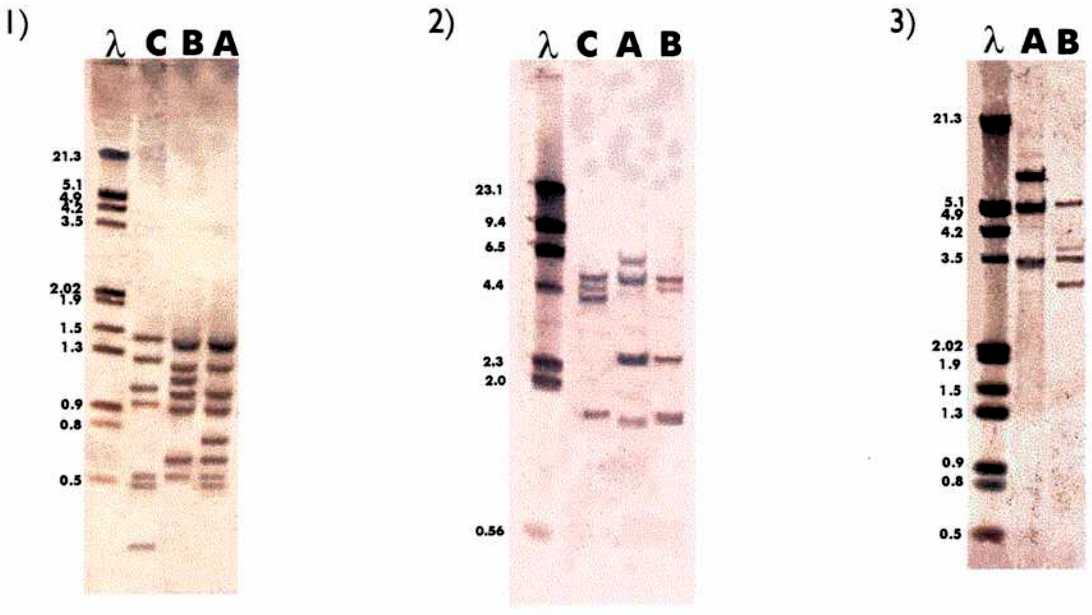

Fig. 3: Southern blot del ADN total de D. elongatus digerido con diferentes enzimas de restricción: 1) *Hinf*I, 2) *Hind*III y 3) *Hae*III . Las líneas A, B y C muestran los distintos patrones encontrados para el ADNmt con estas enzimas. En 1 y 3: λ (marcador de peso molecular) está digerida con *Eco*RI y *Hind*III, en 2: λ se digirió con *Hind*III.

Las enzimas *Alu*I, *Mbo*I y *Hinf*I produjeron el mayor número de bandas, muchas de ellas de bajo peso molecular. Debido a que la suma de estos fragmentos es comparativamente bajo con respecto al tamaño total de la molécula de ADNmt se supone la presencia de fragmentos muy pequeños que son indetectables por esta técnica.

Tabla 2: Patrones de restricción y tamaño de los fragmentos (Kb).

Enzima	Patrones	Tamaño Fragmentos
*Hind*III	A	6.4; 5.1; 2.5; 1.5
	B	5.1; 4.8; 2.5; 1.6; 1.5
	C	5.1; 4.8; 4; 1.6
*Sac*I	A	5.3; 4.8; 2.9; 2; 1
*Eco*RI	A	7.6; 5.7; 1.5; 1.1
*Xba*I	A	13.7; 2.6
*Bam*HI	A	15.8
*Hha*I	A	16.3
*Hae*III	A	7.1; 5.2; 3.1
	B	5.2; 4.4; 3.1; 2.7
*Mbo*I	A	2.6; 2.4; 2.2; 0.85; 0.63; 0.5; 0.45; 0.4; 0.36
*Hinf*I	A	1.5; 1.3; 1.1; 0.95; 0.72; 0.66; 0.61; 0.57; 0.52; 0.48; 0.35;
	B	1.5; 1.3; 1.2; 1.1; 0.95; 0.66; 0.61; 0.57; 0.52; 0.35;
	C	1.5; 1.3; 1.1; 0.95; 0.61; 0.6; 0.57; 0.52; 0.48; 0.46; 0.35; 0.2*; 0.12*
*Alu*I	A	1.4; 1.2; 0.95; 0.74; 0.66; 0.6; 0.36; 0.3; 0.25; 0.21

Los fragmentos indicados con asterisco no fueron observados pero se asumen bajo el Criterio de pasos mutacionales mínimos involucrados en el cambio.

Todos los individuos exhibieron los mismos patrones de sitios de restricción para *Sac*I, *Eco*RI, *Xba*I, *Bam*HI, *Hha*I, *Mbo*I y *Alu*I. Se encontraron polimorfismos para *Hind*III, *Hae*III y *Hinf*I (Fig. 3). A partir de los 12 haplotipos diferentes detectados se dedujo la existencia de 16 sitios polimórficos en las poblaciones analizadas. La tabla 3 muestra las frecuencias haplotípicas absolutas. El haplotipo 1 (H1) está presente en todas las muestras poblacionales. H5 y H6 están ampliamente distribuidos, mientras que H12 sólo estuvo presente en la población de FA localizada en la provincia biogeográfica de Las Yungas.

La tabla 3 también muestra las diversidades haplotípica y nucleotídica. LP y LU, ambas localizadas en la provincia biogeográfica Pampeana, exhiben los valores más bajos de variabilidad del ADNmt. Considerando los intervalos de confianza, la diversidad haplotípica en estas poblaciones sería estadísticamente diferente del resto de las poblaciones. Dentro de la provincia de Las Yungas, CQ es la población menos variable y FA la más variable. Las poblaciones del Espinal muestran similar variabilidad del ADNmt (Tabla 3). Cuando se comparó la diversidad haplotípica entre las provincias biogeográficas, el valor promedio de Las Yungas (0.79 +/- 0.03) fue estadísticamente mayor que los valores observados en las provincias Pampeana y Espinal (0.68 +/- 0.03 y 0.61 +/- 0.05), que no difieren entre sí.

El número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre pares de haplotipos varió entre 0.66% y 3.84% (Tabla 4). El fenograma de Neighbor-Joining basado en las comparaciones de apares entre todos los haplotipos, agrupó a los haplotipos exclusivos (2, 3, 4 y 6) de la región del Este (provincias Pampeana y del Espinal) con el haplotipo 1. Los haplotipos 7, 8, 9, 10, 11 y 12 de la región del Noroeste (provincia de Las Yungas) se unieron en otro grupo. Los haplotipos 5 y 3 se ubicaron

Tabla 3: Composición de los genotipos (Haplotipos, frecuencias haplotípicas y diversidad haplotípica incluyendo error standard, diversidad nucleotídica (%) y el tamaño muestral (N) de las poblaciones estudiadas.

Regiones Geográficas		Noroeste				Este								
Provincias Biogeográficas		Las Yungas				Espinal					Pampeana			
Poblaciónes		HM	RA	FA	CQ	CO	DA	PA	CE	GU	EP	LP	LU	ES
Haplotipos	Genotipos													
1	BAB	4	5	2	6	7	9	8	2	5	2	11	14	4
2	AAB					1		1	2		1	1		
3	AAA								1		1			
4	BAC					1	1		5	3	1			3
5	BAA		5		5	2	3	4	1	2				
6	AAC					1	2	2	2	3	5			8
7	CBB	5		4										
8	BAA	1		2										
9	BBB	2		1									1	
10	CAB		1		1									
11	BBA		1	1										
12	CBA			2										
Diversidad Haplotípica		0.710	0.667	0.826	0.594	0.638	0.598	0.644	0.768	0.725	0.783	0.159	0.129	0.625
Error standard		0.053	0.057	0.044	0.054	0.097	0.082	0.067	0.059	0.049	0.063	0.094	0.079	0.058
Diversidad Nucleotídica		0.815	0.844	1.035	0.749	0.905	0.908	0.964	1.145	1.085	1.211	0.151	0.089	0.936
N		12	12	12	12	15	15	15	12	12	12	12	15	15

La composición de los genotipos se anota en letra mayúscula y en el siguiente orden: *Hind*III, *Hae*III y *Hinf*I. Se omitieron los patrones comunes.

Tabla 4: Número de sustituciones nucleotídicas (%) por sitio entre pares de haplotipos mitocondriales.

Haplotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.908	1.850	1.345	1.124	2.077	1.369	2.077	0.665	2.077	1.850	2.077
2			1.154	2.077	1.850	1.382	2.115	1.393	1.369	2.077	2.623	2.854
3				1.816	0.664	1.133	2.854	2.623	2.077	0.884	1.367	1.592
4					1.104	0.652	2.800	2.077	2.040	2.260	1.816	3.025
5						1.816	2.077	1.850	1.345	0.653	0.664	1.440
6							3.610	2.854	1.816	3.025	2.573	3.840
7								0.683	0.664	1.344	1.382	0.671
8									1.369	2.077	1.154	1.382
9										0.653	2.077	1.344
10											1.344	0.652
11												0.671
12												

entre ambos grupos exhibiendo una diferenciación intermedia con respecto a los haplotipos de cada región (Fig. 4).

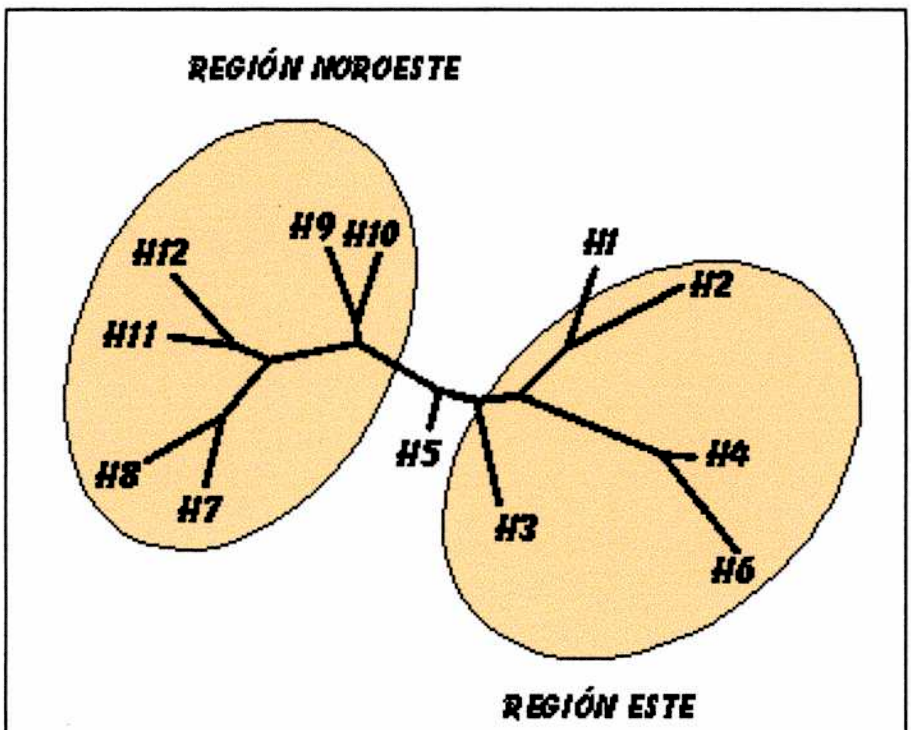

Fig. 4: Arbol obtenido por el método de Neighbor-Joining basado en la divergencia nucleotídica entre pares de haplotipos mitocondriales. Los haplotipos exclusivos de cada región geográfica están encerrados en sendas elipses. Región Noroeste: provincia de Las Yungas. Región Este: provincias del Espinal y Pampeana.

La figura 5 muestra el árbol filogenético de consenso sin raíz entre los haplotipos de ADNmt. Los haplotipos 1 y 5 ocupan la posición central del mismo y están presentes en ambas regiones. Sin embargo, H1 es el más frecuente y es el único que apareció en todas las muestras poblacionales. Centrado en este haplotipo, el árbol incluye tres diferentes ramas: una agrupa a los haplotipos del noroeste de Las Yungas (H8, H10, H11 y H12) junto con H5. El segundo abarca a H9 y H7,

ampliamente distribuidos en las poblaciones del sudoeste de Las Yungas (HM y FA). El último grupo contiene a los haplotipos exclusivos de la región del este.

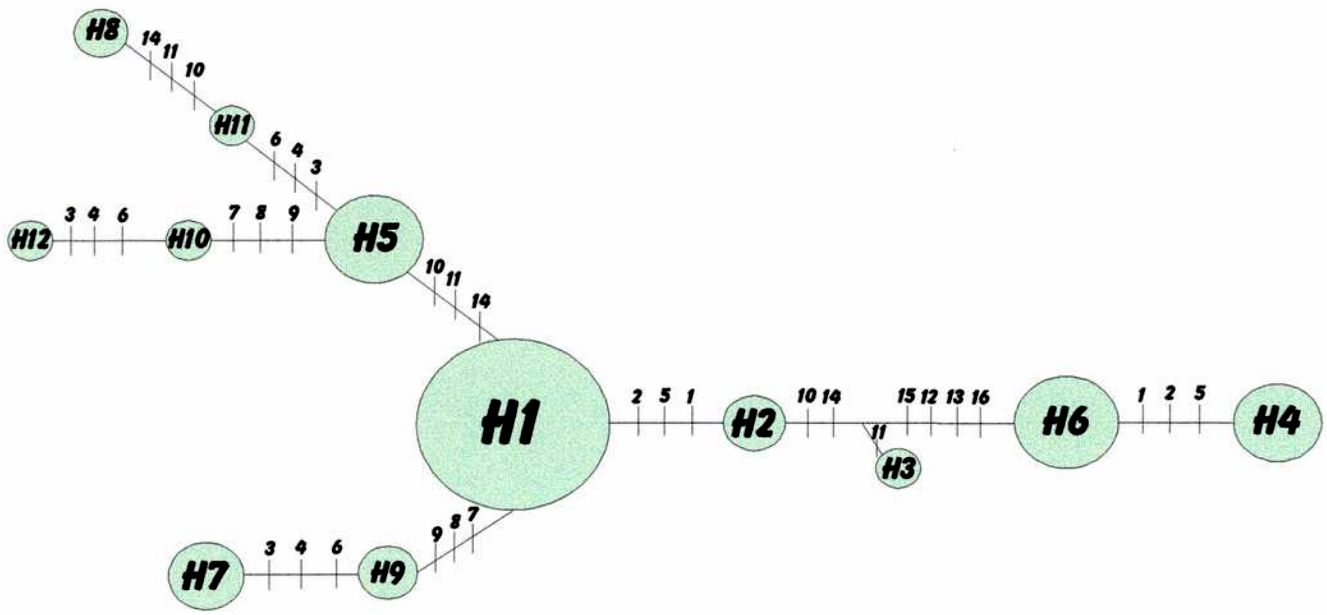

Fig. 5: Arbol filogenético de consenso de los 12 haplotipos mitocondriales identificados en los 171 individuos. Las líneas verticales indican los cambios en los sitios (para cada enzima de restricción) que separan los haplotipos vecinos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos.

Análisis del agrupamiento de las poblaciones de *Dichroplus elongatus* según el ADN mitocondrial

La divergencia nucleotídica entre las poblaciones de *D. elongatus* varió entre 0.015 y -0.1 10^{-4}. Los valores negativos fueron más frecuentes para los pares de poblaciones dentro de la región del este donde la variación intrapoblacional fue mayor que la interpoblacional. FA y ES presentaron los valores más altos de divergencia (Tabla 5).

Tabla 5: Valores de divergencia nucleotídica d_A (x 10^2) entre poblaciones (diagonal superior) y valores de distancias geográficas (metros) entre poblaciones (diagonal inferior).

	HM	RA	FA	CQ	CE	GU	EP	DA	CO	PA	LP	LU	ES
HM		0.465	0.032	0.447	0.957	0.757	1.043	0.481	0.441	0.464	0.427	0.386	1.237
RA	15.9		0.506	-0.053	0.413	0.277	0.418	0.086	0.102	0.056	0.36	0.347	0.708
FA	32.6	48.9		0.563	1.115	0.978	1.17	0.718	0.69	0.677	0.81	0.769	1.459
CQ	207	193	239		0.39	0.243	0.416	0.04	0.047	0.016	0.254	0.242	0.684
CE	977	993	955	1161		-0.056	-0.061	0.144	0.161	0.158	0.575	0.625	-0.048
GU	958	974	937	1137	55.5		0.017	0.024	0.041	0.052	0.368	0.389	0.035
EP	932	949	915	1104	151	95.5		0.216	0.233	0.198	0.707	0.756	-0.012
DA	699	726	688	898	268	258	262		-0.062	-0.053	0.115	0.123	0.34
CO	722	738	698	912	261	254	263	18.3		-0.061	0.068	0.084	0.363
PA	724	741	702	909	253	237	231	33.3	46		0.123	0.138	0.366
LP	1150	1166	1127	1338	180	220	291	441	428	429		-0.001	0.834
LU	1372	1389	1348	1562	405	444	515	665	653	654	224		0.876
ES	1057	1073	1035	1245	102	153	238	348	335	337	95.5	316	

Los dendrogramas obtenidos por los métodos de UPGMA y Neighbor-Joining basados en los valores de divergencia nucleotídica (d_A) (Fig. 6A y 6B) entre poblaciones mostró cinco grupos principales: el primero incluye dos poblaciones de Las Yungas (HM y FA). El segundo agrupó a las dos poblaciones restantes de esta misma provincia (RA y CQ). A la vez este grupo se une al tercero que contiene a las

tres poblaciones de la provincia del Espinal (DA, CO y PA). Los dos grupos restantes abarcan a las poblaciones de la provincia Pampeana.

La comparación entre las matrices de distancias genéticas y geográficas (Tabla 5) a través de la prueba de Mantel es consistente con los dendrogramas. Cuando se consideraron todas las poblaciones la correlación entre las matrices, aunque baja, fue significativa ($r = 0.4177$, $p = 0.0011$). Dentro de la provincia de Las Yungas se observó una falta de concordancia entre las distancias geográficas y genéticas ($r = -0.4834$, $p = 0.8772$). Por el contrario, en la provincia Pampeana se encontró un valor de correlación relativamente alto ($r = 0.5445$, $p = 0.0233$). Debido al bajo número de poblaciones muestreadas esta comparación no pudo hacerse en la provincia del Espinal.

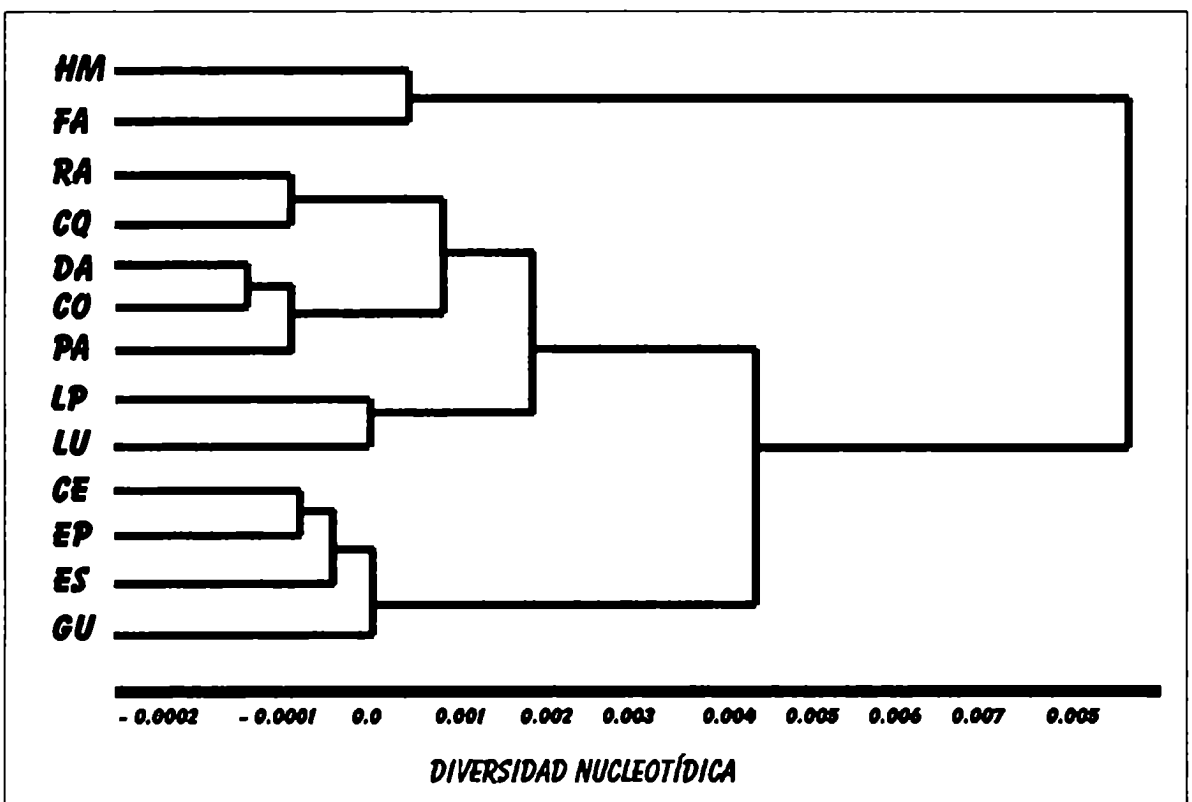

Fig. 6A: Dendrograma de las divergencias nucleotídicas 10^{-} entre las poblaciones de *D. elongatus* basado en el análisis de UPGMA. HM: Horco Molle, RA: Raco, FA: Famailla, CQ: Campo Quijano, PA: Paraná, DA: Desvío Arijón, CO: Coronda, CE: Ceibas, EP: El Palmar, GU: Gualeguaychú, ES: Escobar, LP: La Plata, LU: La Lucila.

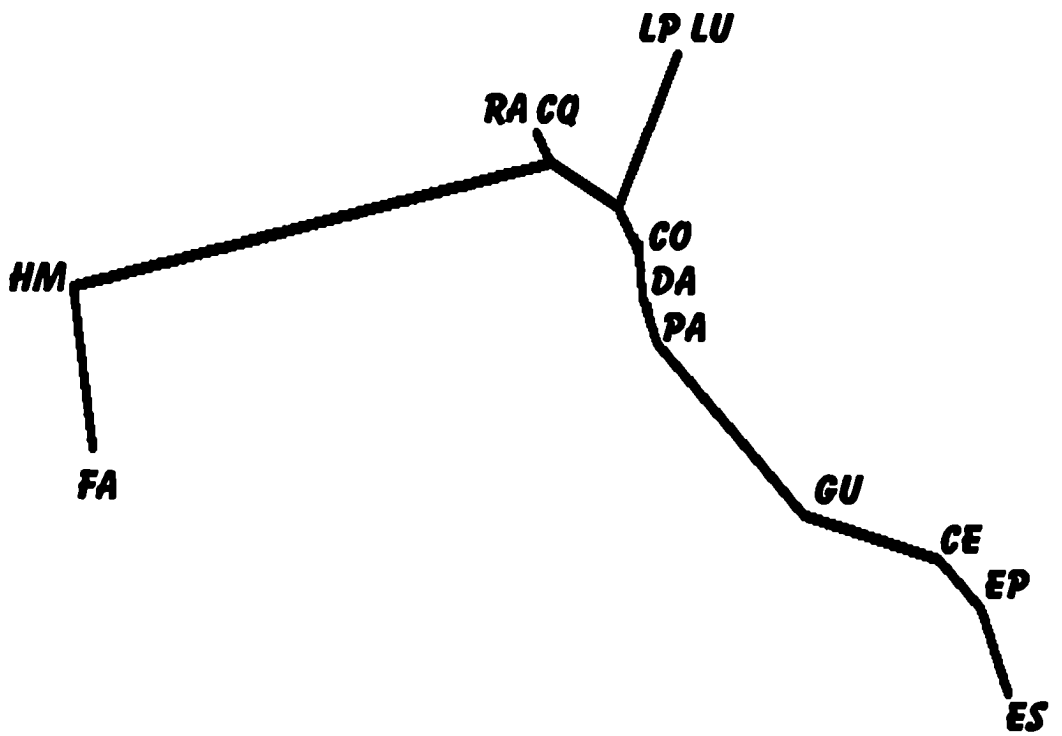

Fig. 6B: Dendrograma obtenido por el método de Neigbor-Joining utilizando las divergencias nucleotídicas entre poblaciones de *D. elongatus*. HM: Horco Molle, RA: Raco, FA: Famailla, CQ: Campo Quijano, PA: Paraná, DA: Desvío Arijón, CO: Coronda, CE: Ceibas, EP: El Palmar, GU: Gualeguaychú, ES: Escobar, LP: La Plata, LU: La Lucila.

Diferenciación genética entre poblaciones y provincias biogeográficas según el ADN mitocondrial

Cuando se compararon las poblaciones de las diferentes provincias, se detectó una heterogeneidad significativa en la distribución del ADNmt ($\chi^2 = 86.97$, $p = 10^{-5}$). En todos los casos se demostró heterogeneidad significativa entre provincias biogeográficas (Yungas vs Pampeana, $\chi^2 = 63.23$, $p = 10^{-5}$; Yungas vs Espinal, $\chi^2 = 30.99$, $p = 10^{-5}$; Pampeana vs Espinal, $\chi^2 = 14.86$, $p = 0.011$).

Dentro de la provincia Pampeana se observó una heterogeneidad significativa en la frecuencia de haplotipos de ADNmt ($\chi^2 = 64.71$, $p = 10^{-5}$). Este valor decrece sustancialmente cuando LP y LU son excluidas del análisis, evidenciándose homogeneidad en la distribución de los haplotipos entre las poblaciones restantes ($\chi^2 = 18.4$, $p = 0.24$). A su vez, LP y LU entre sí muestran frecuencias similares de los haplotipos ($\chi^2 = 2.05$, $p = 0.69$).

En la provincia de Las Yungas, se observaron diferencias significativas entre poblaciones en la frecuencia de los haplotipos ($\chi^2 = 38.61$, $p = 0.004$). Sin embargo, las poblaciones localizadas en el extremo sudeste de Las Yungas (FA y HM) exhibieron una clara homogeneidad para la distribución del ADNmt ($\chi^2 = 4.44$, $p = 0.54$). El mismo resultado se obtuvo cuando la comparación se hizo entre las poblaciones ubicadas en el extremo oeste de esta provincia (RA y CQ) ($\chi^2 = 1.09$, $p = 0.82$). A su vez, se detectaron diferencias significativas cuando se compararon las poblaciones de un extremo y otro de Las Yungas ($\chi^2 = 30.47$, $p = 10^{-5}$).

Se observó homogeneidad en la distribución de los haplotipos mitocondriales entre las poblaciones de la provincia del Espinal ($\chi^2 = 2.88$, $p = 0.98$).

DISCUSIÓN

Distribución filogeográfica de los haplotipos mitocondriales en *Dichroplus elongatus*

En los años recientes el ADN mitocondrial ha inspirado una nueva clase de perspectivas genealógicas sobre la estructura poblacional y el flujo génico debido a su rápida evolución, su herencia materna y su falta de recombinación (Avise 1994). Por lo tanto, la naturaleza filogenética de la información contenida en el ADNmt ha contribuido al estudio de los factores histórico-demográficos sobre las distribuciones filogeográficas de los linajes en las poblaciones contemporáneas (Avise 1996).

En el presente trabajo se estudió la variación de la molécula mitocondrial en poblaciones naturales de un saltamontes sudamericano ampliamente distribuido en Argentina: *Dichroplus elongatus*. Con el objeto de establecer los patrones biogeográficos, se analizaron poblaciones provenientes de tres grandes provincias biogeográficas: 1) Provincia pampeana. 2) Provincia del Espinal. 3) Provincia de Las Yungas.

Como se indicó previamente, la variabilidad del ADNmt en *D. elongatus* medida a través de las diversidades nucleotídica y haplotípica fue relativamente alta. Tal es así que los valores de diversidad nucleotídica intrapoblacional en *D. elongatus* son tan altos como los valores más altos de diversidad nucleotídica intraespecífica en la familia Oedipodinae medidos por Martel y Chapco (1995) y varias veces superiores que los valores detectados en especies de la familia Melanoplinae por Chapco *et al.* (1994). Además, el número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre haplotipos es relativamente superior a los valores estimados para los haplotipos

mitocondriales en *Melanoplus sanguinipes* por Chapco *et al.* (1992). Estos resultados sugieren que las poblaciones de *D. elongatus* serían considerablemente antiguas y que existiría cierto grado de aislamiento reproductivo entre ellas.

Los haplotipos mitocondriales de *D. elongatus* presentaron un patrón geográfico de distribución. De los 12 haplotipos detectados, sólo el H1 estuvo presente en todas las poblaciones, mientras que la mayoría de los haplotipos restantes estuvieron presentes sólo en la región del noroeste (Las Yungas) o sólo en la región del este (Pampeana y Espinal). Esta clara distribución se observa en el árbol obtenido por el método de Neighbor-Joining (Fig. 4). Además esta figura muestra que H1 (el haplotipo más común) está dentro del grupo que incluye los haplotipos pertenecientes a la región del Este, señalando menor diferenciación entre estos haplotipos con el H1. Esta menor diferenciación entre H1 y los haplotipos del este sugiere que las poblaciones de esta región serían de una colonización más reciente.

Para alcanzar una interpretación filogeográfica de la distribución de los haplotipos de *D. elongatus*, es interesante analizar simultáneamente la posición de los haplotipos en un árbol filogenético y compararla con la localización geográfica de los mismos. El árbol filogenético ubicó al haplotipo 1 en la posición central. Este hecho, sumado a que este haplotipo es el más frecuente y es el único presente en todas las poblaciones, nos permitió asumir que H1 es el ancestro común y que el resto de las variantes haplotípicas derivaron de éste. Asimismo, el árbol filogenético presenta tres claras ramas. Una rama corresponde a los haplotipos exclusivos de la región del Este los cuales divergieron directamente del haplotipo ancestral. Las dos ramas restantes incluyen a los haplotipos pertenecientes a la región del Noroeste. Una de estas ramas corresponde a los haplotipos encontrados en el extremo sudeste de Las Yungas (HM y FA). En esta rama, H9 se habría originado del haplotipo

ancestral (H1) y por consiguiente H7 habría derivado de H9. En la tercer rama, el resto de los haplotipos de Las Yungas (H8, H10, H11 y H12) aparecen unidos a H5, sugiriendo que estos haplotipos podrían haberse originado directa o indirectamente de H5.

El árbol filogenético es consistente con un patrón geográfico de distribución de los haplotipos. En general, los patrones filogeográficos deducidos a partir del ADNmt pueden explicarse a través de eventos genéticos, procesos demográficos y factores históricos (Templeton *et al.* 1995). Asimismo, Avise (1994) sugiere que limitaciones en la vagilidad y la fragmentación ambiental podrían explicar la mayoría de los patrones filogeográficos del ADNmt. En nuestro caso, *D. elongatus* es un saltamontes con gran vagilidad debido a que posee alas y muestra una gran habilidad voladora (puede desplazarse hasta 50 - 60 mts. en un salto, de acuerdo a nuestras observaciones). Sin embargo, esta capacidad motriz no significaría, necesariamente, flujo génico debido a que la fragmentación ambiental, podría reducir la oportunidad de migración entre las poblaciones vecinas geográficamente. En otras palabras, el flujo génico se vería reducido debido la fragmentación ambiental lo que se traduciría en un patrón de distribución geográfico del ADNmt y cierto grado de heterogeneidad entre los haplotipos mitocondriales de poblaciones cercanas geográficamente. Por consiguiente, poblaciones vecinas tales como HM y RA, pero localizadas en diferentes extremos de Las Yungas mostrarían patrones de distribución del ADNmt distinguibles debido la fragmentación ambiental. De hecho, la selva nublada característica de Las Yungas no es un ambiente apropiado para *D. elongatus*, lo que reduciría la migración a través de esta provincia biogeográfica. Por lo tanto, el contacto entre las poblaciones sólo podría ocurrir bordeando Las Yungas, una vía poco directa y que podría requerir muchas generaciones. En consecuencia, nuestros

resultados son consistentes con una separación temprana entre las poblaciones que colonizaron diferentes bordes de Las Yungas.

Variación para el ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus* bajo un contexto ecológico

El fenograma basado en las distancias genéticas es relativamente coherente con la distribución geográfica de las poblaciones. Ciertos grupos parecen bastante naturales dado que involucran a poblaciones con los mismos haplotipos derivados y distribuidos en las mismas provincias biogeográficas (por ejemplo: CO-PA-DA de la provincia del Espinal y CE-EP-GU-ES de la provincia Pampeana). Sin embargo, se observaron ciertas discrepancias en otros agrupamientos. Las poblaciones de la provincia biogeográfica de Las Yungas forman dos grupos, HM y FA por un lado y RA y CQ por otro, que a su vez se unen a las poblaciones de la provincia del Espinal.

En general, los resultados del análisis de heterogeneidad del ADNmt dentro de las provincias biogeográficas son consistentes con los fenogramas obtenido a partir de las divergencias interpoblacionales observándose por un lado diferencias no significativas en la frecuencia de los haplotipos dentro de los grupos principales y por el otro heterogeneidad significativa entre ellos. La ausencia de diferenciación en el ADNmt entre las poblaciones de CO, PA y DA sugiere que existe un flujo génico sustancial entre estas poblaciones del Espinal. En contraposición, se observó una variabilidad significativa en el ADNmt dentro de las provincias Pampeana y de Las Yungas. En la provincia Pampeana, de acuerdo con los patrones mitocondriales, se reconocen dos grupos que podrían estar asociados a los diferentes distritos dentro de esta provincia. Por un lado, las poblaciones de LP y LU del distrito Oriental, ambas con los valores más bajos de variabilidad mitocondrial intrapoblacional, por el otro las poblaciones de EP, CE, GU y ES pertenecientes al distrito Uruguayensis. Se han descripto ciertas diferencias ecológicas entre ambos distritos (Cabrera y Willink

1980), la selva ribereña y la alta humedad en el distrito Uruguayensis contra la falta de elementos tropicales en el distrito Oriental. Por lo tanto, impedimentos en el flujo génico entre poblaciones pertenecientes a diferentes distritos podrían explicar la heterogeneidad en el ADNmt dentro de esta provincia biogeográfica. La alta frecuencia de H1 en LP y LU, la baja variabilidad intrapoblacional y la diferenciación de ambas con el resto de las poblaciones de su misma provincia biogeográfica permite suponer que algunos procesos evolutivos relacionados con la deriva genética podrían haber causado la pérdida de algunos haplotipos. Además, cabe destacar que LP es una población peri-urbana, que se encuentra en una zona muy afectada por la mano del hombre. Este hecho podría influir sobre la capacidad expansiva de esta población disminuyendo su Ne, y por lo tanto favoreciendo la acción de la deriva genética. Sin embargo, esto no parece ser el caso de la población de LU. En otras especies como *Drosophila buzzatii* se observó que la colonización acompañada por cuello de botella o efecto fundador conduciría a una baja variabilidad y diferenciación interpoblacional (Halliburton y Baker 1993, Rossi et al. 1996). Por lo tanto, y considerando las diferencias geográficas y ecológicas que afectan a LP y LU, no puede descartarse la posibilidad de que la baja variabilidad intrapoblacional detectada sea una consecuencia de colonizaciones recientes de esta área. Sin embargo, para poder arribar a una explicación certera, sería necesario información sobre la historia de colonización de *D. elongatus* y datos adicionales para determinar la causa real de la reducida variabilidad en estas poblaciones.

En la provincia de Las Yungas, existe una significativa heterogeneidad en el ADNmt entre las poblaciones del sudeste (HM-FA) y las del oeste (RA-CQ). Nuestros resultados sugieren que existen restricciones sustanciales en el flujo génico entre ambos extremos de la provincia de Las Yungas. La alta humedad y la moderada

temperatura caracterizan al sudeste de esta provincia, donde están ubicadas HM y FA, mientras que temperaturas más bajas y menor humedad distinguen a RA y CQ en el extremo oeste de Las Yungas. Además, *D. elongatus* no está presente en la selva nublada que separa ambas áreas, por lo tanto fuertes barreras ecológicas que evitarían el flujo génico explicarían la diferenciación detectada a nivel del ADNmt.

Estudios isoenzimáticos en poblaciones de *D. elongatus* de Tucumán (región Noroeste) y Buenos Aires (región Este) (Sequeira *et al.* 1997) mostraron que una aparente asociación de los loci aspartato-amino-transferasa (AAT) y peptidasa (PEP) con variables geográficas (latitud) y climáticas (temperatura) que podrían tener una causa selectiva. Además, el fenograma construido a partir de las distancias genéticas no se vincula con lo esperado considerando las distancias geográficas (Sequeira *et al.* 1997). Este estudio incluyó las poblaciones de RA, HM y FA analizadas en el presente trabajo. Comparando con nuestras observaciones, los resultados isoenzimáticos también mostraron diferencias entre RA y las poblaciones del sudeste de Las Yungas (HM y FA). Sin embargo, la diferenciación del ADNmt detectado en esta provincia biogeográfica a la luz de los resultados presentados en el presente estudio parecen mejor explicados sobre base de flujo génico libre o restringido por factores ecológicos y geográficos.

Por lo tanto, en *D. elongatus*, los patrones de distribución de la variación del ADNmt detectado en las poblaciones estudiadas podrían explicarse por aislamiento por distancia entre las principales provincias biogeográficas (Las Yungas, Espinal y Pampeana) y dentro de las provincias de Las Yungas y Pampeana, factores ecológicos podrían haber contribuido a la diferenciación genética entre las poblaciones.

Capítulo V:

Variación del ADN ribosómico en poblaciones naturales de *Dichroplus elongatus*

RESULTADOS

Descripción de los patrones y fragmentos ribosómicos detectados en las poblaciones analizadas de *Dichroplus elongatus*

Se analizaron los patrones de restricción para la región del espaciador no transcripto (NTS) del ADN ribosómico (ADNr) nuclear en 156 individuos mediante digestiones simples empleando cinco enzimas de restricción: *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I y *Xba*I. Se detectaron 21 fragmentos de restricción de los cuales 17 fueron polimórficos. Se detectaron variaciones en el tamaño de los fragmentos a escala individual, poblacional e interpoblacional. Solo *Bam*HI presentó un único patrón de bandas para todos los individuos analizados (Fig. 7). La figura 7 muestra los patrones encontrados para *Hind*III, *Pst*I, *Xba*I y *Bam*HI. *Eco*RI presentó el mayor número de variantes para la longitud originando el mayor número de patrones diferentes de fragmentos de restricción (Fig. 8 y 9).

Las digestiones dobles permitieron identificar el número de sitios involucrados para cada patrón encontrado (Fig. 10 y 11A y B). Dado que en un mismo individuo puede haber más de un repetipo debido al alto número de copias de la unidad repetida intraindividual, no pudieron ser identificados los repetipos presentes en cada individuo analizado. Sin embargo, el alto número de bandas detectadas sugiere variación dentro de los individuos debido a la existencia de más de un repetipo.

Las digestiones simples con *Pst*I revelaron la presencia de tres fragmentos de restricción cuya combinación originó cinco patrones que presentaron diferencias en su distribución (Fig. 7).

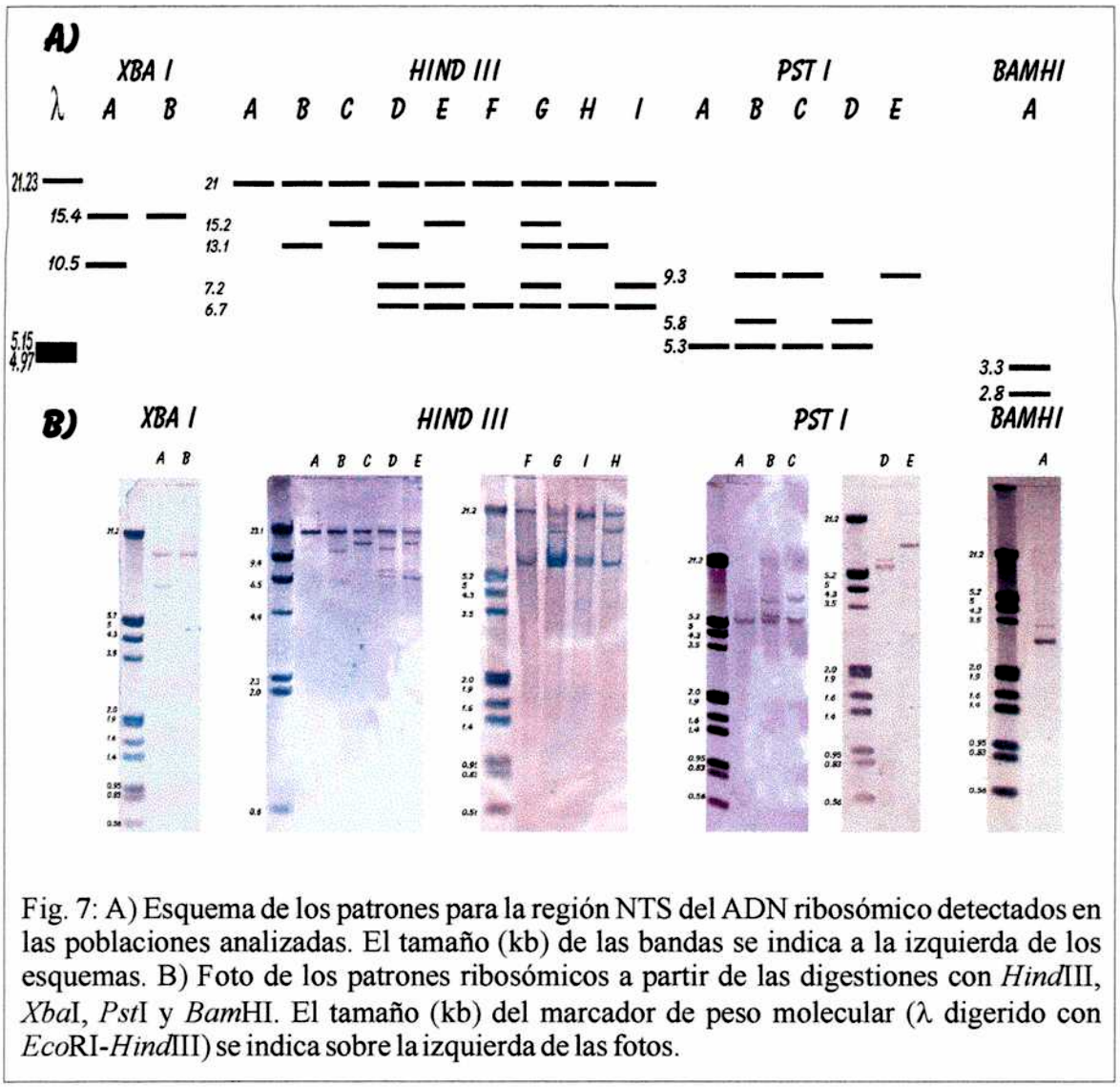

Fig. 7: A) Esquema de los patrones para la región NTS del ADN ribosómico detectados en las poblaciones analizadas. El tamaño (kb) de las bandas se indica a la izquierda de los esquemas. B) Foto de los patrones ribosómicos a partir de las digestiones con *Hind*III, *Xba*I, *Pst*I y *Bam*HI. El tamaño (kb) del marcador de peso molecular (λ digerido con *Eco*RI-*Hind*III) se indica sobre la izquierda de las fotos.

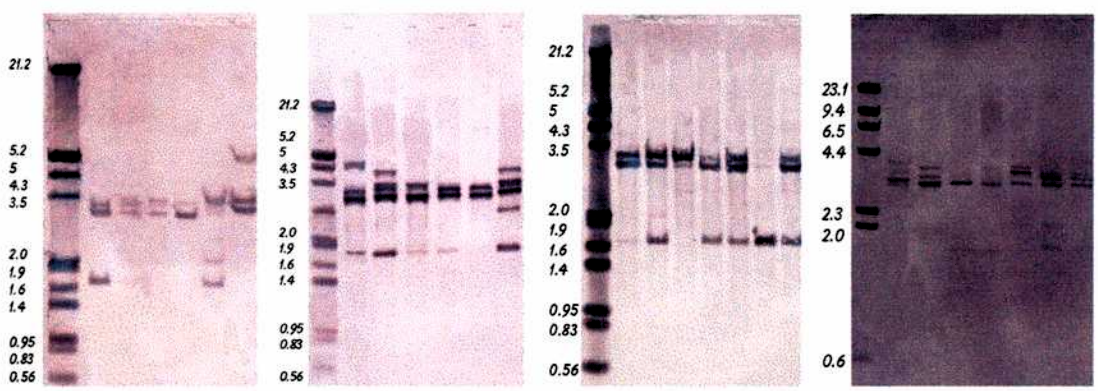

Fig. 8: Las fotos muestran algunos de los patrones para *Eco*RI encontrados en las poblaciones analizadas. λ digerido con *Eco*RI- *Hind*III y λ digerido con *Hind*II fueron utilizados como marcadores de peso molecular. El tamaño del estándar se indica a la izquierda de las fotos.

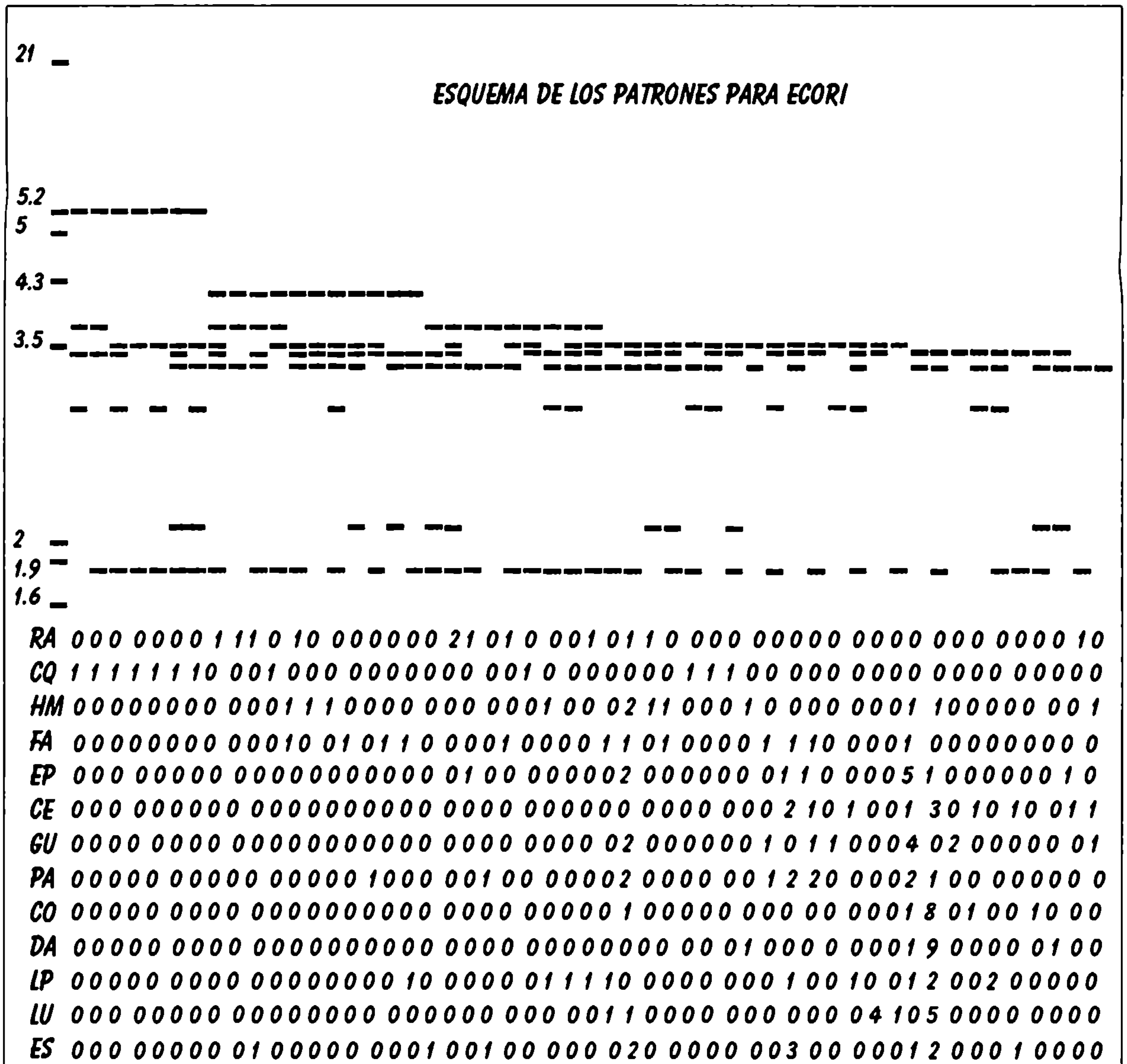

Fig. 9: Esquema de todos los patrones ribosómicos para *Eco*RI encontrados en las poblaciones analizadas. Asimismo, bajo cada uno de los patrones se indica el número de individuos con ese patrón para cada una de las poblaciones analizadas.

Los patrones A, B y C estuvieron ampliamente distribuidos. El patrón A, constituido por la banda de 5.3kb, estuvo presente en todos los individuos de las poblaciones analizadas, mientras que los patrones B y C estuvieron ausentes en las poblaciones de CO y LU, respectivamente. El patrón D se presentó en muy baja frecuencia y sólo se detectó en un individuo de DA y en otro de ES (Tabla 6).

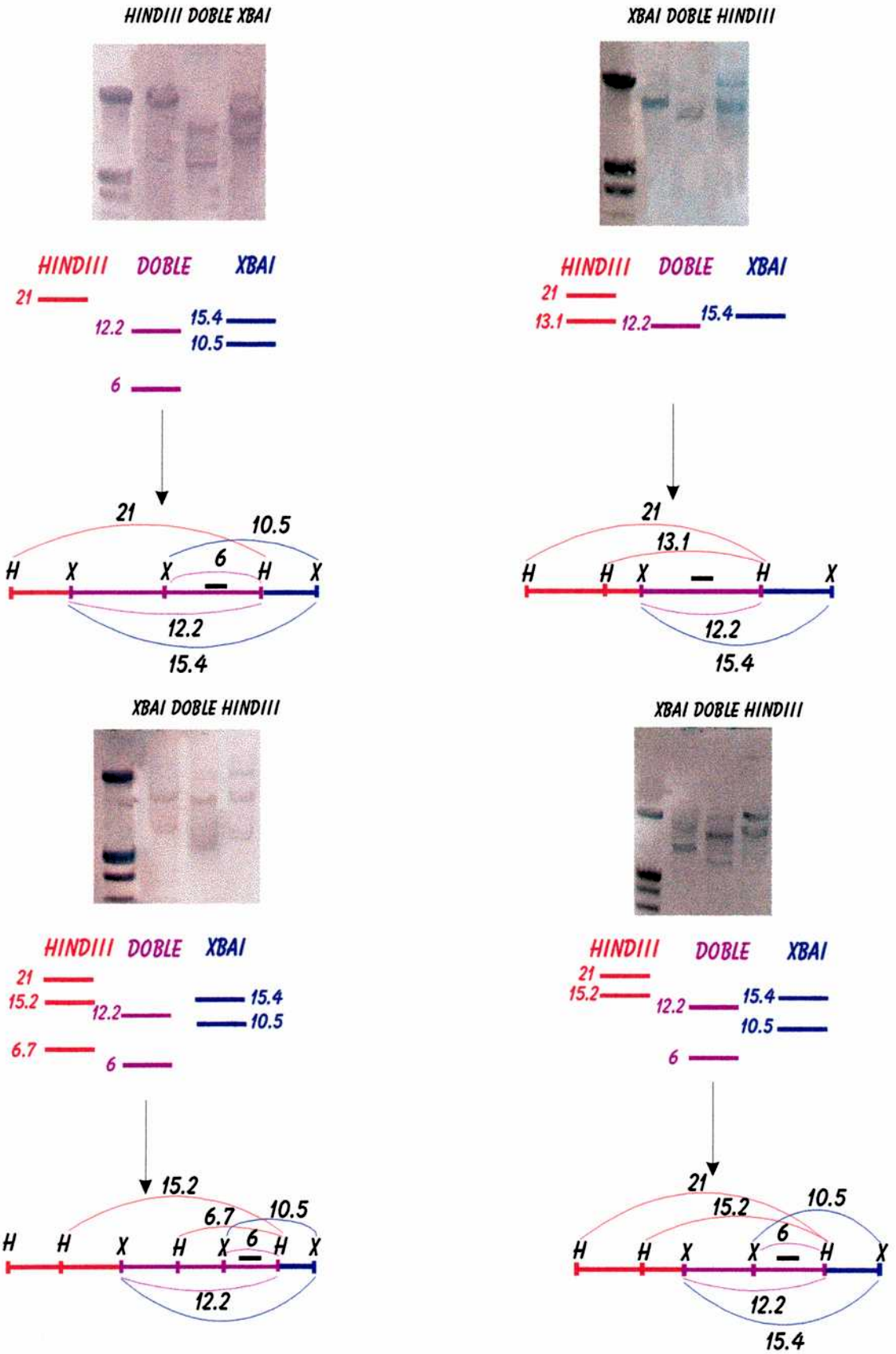

Fig. 11A: Esquema y Southern blots de las digestiones dobles realizadas entre las enzimas *Hind*III y *Xba*I para determinar el número de sitios.

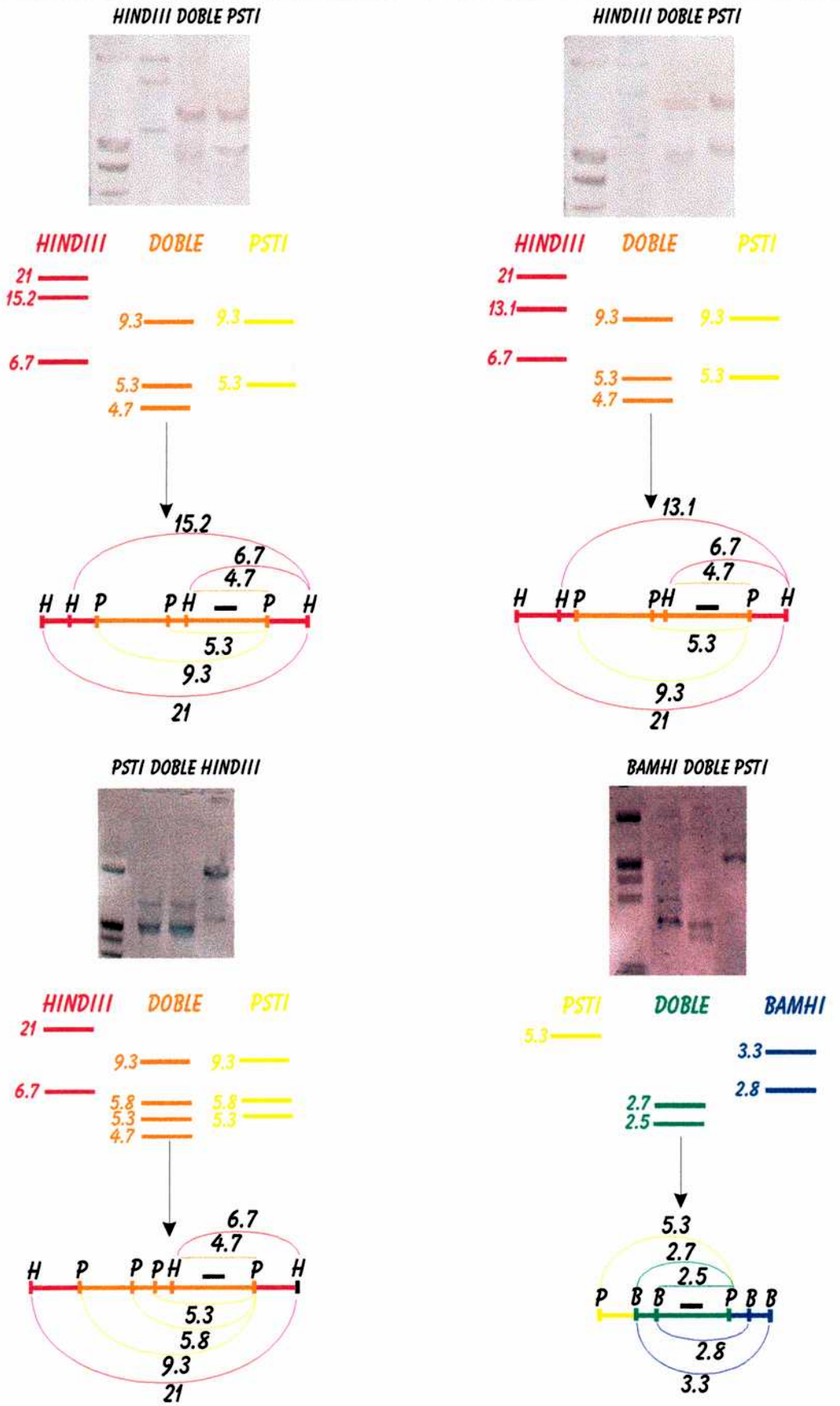

Fig. 11B: Esquema de las digestiones dobles realizadas entre las enzimas *Bam*HI, *Hind*III y *Pst*I para determinar el número de sitos.

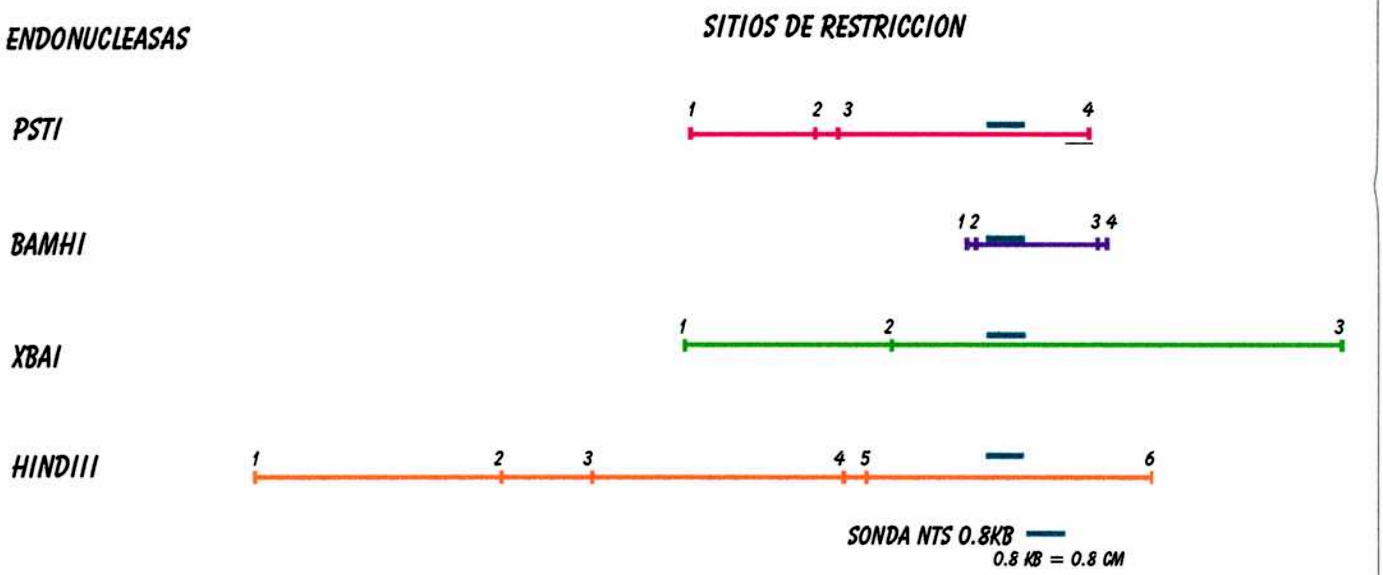

Fig. 10: Esquema de la posición relativa de los sitios de restricción para cuatro de las enzimas estudiadas: *Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III y *Xba*I en la región del NTS analizada.

Las digestiones dobles detectaron la presencia de cuatro sitios de restricción que darían origen a los patrones observados para *Pst*I (Fig. 10). El sitio 4 sería compartido por los tres fragmentos. Mientras que los sitios 1, 2 y 3 serían privados de los fragmentos de 9.3 kb, 5.8 kb y 5.3 kb, respectivamente (Fig. 7 y 10). Los tres fragmentos detectados con *Pst*I estuvieron presentes en todas las poblaciones analizadas siendo el menos frecuente el fragmento de 5.8 kb, excepto en la población de LU donde se encontró en 10 de los 12 individuos analizados (Tabla 7).

Las digestiones simples con *Hind*III revelaron cinco variantes en el tamaño de los fragmentos de restricción (desde 21kb a 6.7kb), originando 10 patrones diferentes (Fig. 7).

Tabla 6: Frecuencia absolutas de patrones ribosómicos en las poblaciones analizadas. Similitud intrapoblacionales calculadas a partir de Hedrick (Si_h) y Lynch (Si_l) utilizando *BamH*I, *Hind*III, *Xba*I y *Pst*I. Tamaño muestral (N) de las poblaciones estudiadas.

Regiones Geográficas		Noroeste					Este						
Provincias Biogeográficas		Las Yungas					Espinal			Pampeana			
Poblaciones		HM	RA	FA	CQ	CO	DA	PA	CE	GU	EP	LP	LU	ES
Endonucleasa	Patrones													
*Pst*I	A	2	4	1	3	2	1	1	2	2	2	2	2	1
	B	2	1	3	3	0	3	4	2	3	3	4	7	4
	C	8	3	8	4	9	5	6	5	7	4	5	0	5
	D	0	4	0	2	1	2	1	3	0	3	1	3	1
	E	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
*Hind*III	A	7	4	8	0	7	7	8	8	9	8	9	6	5
	B	3	3	2	0	3	4	2	1	2	1	2	1	2
	C	2	0	1	0	2	0	2	1	2	2	2	1	2
	D	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*Xba*I	A	1	3	1	11	10	10	3	2	2	2	3	5	8
	B	11	9	11	1	2	2	9	10	10	10	9	7	2
N		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Si_l		0.889	0.774	0.909	0.871	0.884	0.866	0.866	0.849	0.888	0.853	0.855	0.882	0.833
Si_h		0.648	0.487	0.667	0.409	0.622	0.552	0.613	0.615	0.647	0.666	0.614	0.563	0.506

Los patrones A y B estuvieron presentes en todas las poblaciones analizadas excepto en CQ. El patrón D estuvo sólo presente en las poblaciones de RA y CQ. Mientras que los patrones G, H, I y J fueron privados de CQ. Al igual que el patrón E que sólo se observó en la población de RA (Tabla 6).

Las digestiones dobles revelaron la presencia de 6 sitios de restricción que darían origen a los diferentes fragmentos detectados para *Hind*III. La banda de 21 kb obtenida a partir de la digestión de los sitios 1 y 6 está presente en todos los individuos analizados sugiriendo que estos sitios serían monomórficos. Asimismo, los sitios 4 y 5 que junto con el sitio 6 darían origen a las bandas de bajo peso molecular (7.5 kb y 6.7 kb) estarían presentes mayoritariamente en la población de CQ (Tabla 7 y Fig. 10). Mientras que los sitios 2 y 3 que con la digestión del sitio 6 se obtendrían las bandas de 15.2kb y 13.1kb, respectivamente, estarían ampliamente distribuidos observándose una alta frecuencia de la banda 13.1 kb en la población de CQ (Tablas 7 y Fig. 10).

Los dos fragmentos de restricción obtenidos por las digestiones simples con *Xba*I se combinaron para dar dos patrones que fueron detectados en todas las poblaciones analizadas (Fig. 7). Sin embargo, se detectaron diferencias en la distribución de estos patrones (Tabla 6). El patrón A fue mucho más frecuente en las poblaciones de CQ, ES, CO y DA, mientras que el patrón B estuvo ampliamente distribuido en el resto de las poblaciones analizadas.

Tabla 7: Frecuencia absolutas de las bandas encontradas para ADN ribosómico con cada una de las enzimas dentro de las poblaciones analizadas. El número promedio de bandas presentes para todas las enzimas de restricción analizadas dentro de las poblaciones se indica al pie de la tabla. Tamaño muestral (N) de las poblaciones estudiadas.

Regiones Geográficas		Noroeste					Este						
Provincias Biogeográficas		Las Yungas					Espinal			Pampeana			
Poblaciones Endonucleasa	bandas (kb)	HM	RA	FA	CQ	CO	DA	PA	CE	GU	EP	LP	LU	ES
*Pst*I	9.3	10	4	11	7	9	9	10	7	10	7	9	7	10
	5.8	2	5	2	5	1	5	5	5	3	6	5	10	5
	5.3	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12
*Hind*III	21	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15.2	2	3	1	2	2	0	2	1	2	1	2	1	2
	13.1	2	4	2	10	3	4	2	3	1	2	1	5	4
	7.2	0	4	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.7	0	5	1	12	0	0	0	0	0	0	0	0	1
*Xba*I	15.4	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	10.5	1	3	1	11	10	10	3	2	2	2	3	5	8
*Eco*RI	5.2	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.2	3	4	4	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
	3.8	1	8	1	4	0	0	1	0	0	1	3	0	3
	3.5	8	7	9	10	1	1	7	4	5	4	5	7	5
	3.4	10	7	10	7	12	11	11	10	10	10	11	11	11
	3.1	12	12	11	4	12	12	8	10	6	11	12	7	11
	2.5	2	0	1	6	1	0	1	2	2	0	5	0	0
	2.1	2	2	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	1.8	7	11	5	10	10	9	7	7	4	6	10	8	7
N		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
N° de bandas promedio		10.25	11.58	10.58	13.83	10.17	10.08	9.92	9.25	8.58	9.17	10.5	10	10.33

Se identificaron 3 sitios de restricción para *Xba*I a partir de las digestiones dobles. La digestión de los sitios 1 y 3 daría origen a la banda de 15.4kb presente en todos los individuos analizados. La banda de 10.5kb originada a partir de la digestión de los sitios 2 y 3 sería polimórfica sugiriendo que el sitio 2 también lo sería (Fig. 7 y 10). Asimismo, esta banda se encontró en alta frecuencia en las poblaciones de CQ, CO, DA y ES (Tabla 7).

Como se mencionó previamente, *Eco*RI fue la enzima que originó más fragmentos y patrones (Fig. 8 y 9). La distribución de alguno de éstos resulta muy interesante. En general, los patrones que involucran la presencia de bandas de mayor peso molecular (5.2kb, 4.2kb y 3.8kb) están mayoritariamente distribuidos en las poblaciones de Las Yungas. En particular, la banda de 5.2kb sólo estuvo presente en la población de CQ. Asimismo, los patrones con bandas de menor peso molecular (3.5kb, 3.4kb y 3.1kb) están ampliamente distribuidos, excepto en RA y CQ donde se encuentran en muy baja frecuencia (Fig. 9).

Hay tres patrones que sobresalen del resto por sus amplias distribuciones dado que estuvieron presentes en la mayoría de las poblaciones y en algunos casos (CO, DA y LU) en una alta frecuencia. Este es el caso de los patrones que involucran las bandas de 3.5kb, 3.4kb, 3.1kb y 1.8kb; las de 3.4kb y 3.1kb y las de 3.4kb, 3.1kb y 1.8kb. Otro caso interesante es el patrón que involucra las bandas de 3.5kb y 3.4kb que sólo estuvo presente en LU pero en una frecuencia relativamente alta (Fig. 9).

En general, más de la mitad de los patrones encontrados fueron privados de una determinada población y presentes en uno o dos individuos.

Variabilidad intra e interpoblacional para el ADN ribosómico en *Dichroplus elongatus*

Se observó variación en los fragmentos de restricción dentro de todas las poblaciones analizadas. El número promedio de bandas producidas por individuo fue desde 13.83 hasta 8.58 (Tabla 7), donde el valor más alto fue observado en CQ y el más bajo en GU. Asimismo, dentro de cada provincia biogeográfica, Las Yungas exhibió el valor más alto para el número promedio de bandas por individuo (11.56) comparado con El Espinal (10.06) y Pampeana (9.64). Según el análisis de regresión múltiple utilizando el método de selección por pasos (stepwise regression), el número promedio de bandas totales estaría significativamente asociado con la altitud. Similarmente, la distribución de las bandas de 13.1 kb de *Hind*III, 3.5 kb de *Eco*RI y 5.8 kb de *Pst*I muestra una regresión significativa con esta variable geográfica, estando la banda de 5.8 kb también correlacionada con la latitud. Mientras que la banda de 3.4 kb de *Eco*RI presentaba una asociación significativa y negativa con la altitud (Tabla 8 y 9).

Se analizó la variabilidad intra e interpoblacional del NTS ribosómico a través de los índices de similitud de Lynch (1990) y Hedrick (1983) con el objeto de agrupar las poblaciones de acuerdo a la variación detectada. El agrupamiento de las poblaciones se llevó a cabo mediante el método de Neighbor-Joining.

Inicialmente, se evaluó la variabilidad empleando los datos de todas las enzimas analizadas utilizando el índice de Lynch que relaciona el número de bandas compartidas y número total de bandas entre pares de individuos. Sin embargo, el agrupamiento de las poblaciones no es muy informativo dado que el árbol mostró similares diferencias entre todas las poblaciones analizadas (Fig. 12).

Tabla 8: Datos geográficos de las localidades muestreadas.

		Poblaciones												
		HM	RA	FA	CQ	CO	DA	PA	CE	GU	EP	LP	LU	ES
Datos geográficos	Latitud (s)	26°48	26°40	27°04	24°56	31°59	31°59	31°30	33°28	33°05	32°12	34°55	36°39	34°23
	Longitud (o)	65°19	65°20	65°14	65°25	60°42	60°52	59°55	58°45	58°20	58°09	57°45	56°42	58°45
	Altitud* (mts.)	550	1172	340	1500	18	18	78	------	21	25	19	0	5

*CE datos ausentes

Tabla 9: Análisis de regresión del número de bandas totales y de las bandas polimórficas sobre las variables geográficas. Se indican sólo los coeficientes significativos estimados utilizando el método de selección por pasos (stepwise regression).

Bandas	Altitud	Longitud	Latitud
Bandas tot.	0.002**		
Bandas tot. s/*Eco*RI	0.001*		
3.5 kb *Eco*RI	0.003*		-------
3.4 kb *Eco*RI	-0.002**		-0.003*
13.1 kb *Hind*III	0.003**		
5.8 kb *Pst*I	0.009**	--------	0.003*

*p < 0.05; **p < 0.01

Este hecho podría deberse al alto número de patrones privados detectados para *Eco*RI que podrían estar enmascarando la evaluación de la diferenciación debida al resto de las enzimas. Por lo tanto, en los siguientes análisis, la evaluación de la variabilidad intra e interpoblacional se llevó a cabo excluyendo los datos de *Eco*RI.

Los índices de similitud (Si_J) de Lynch intrapoblacional basado en bandas presentes y ausentes se muestran en la tabla 6. El valor más bajo de similitud (mayor diversidad) lo obtuvo RA, mientras que FA fue la población con mayor similitud intrapoblacional. Los valores de distancia (Dij_J) de Lynch revelaron que las poblaciones más diferenciadas entre sí serían CQ y FA, mientras que las más parecidas serían FA y HM (Tabla 10).

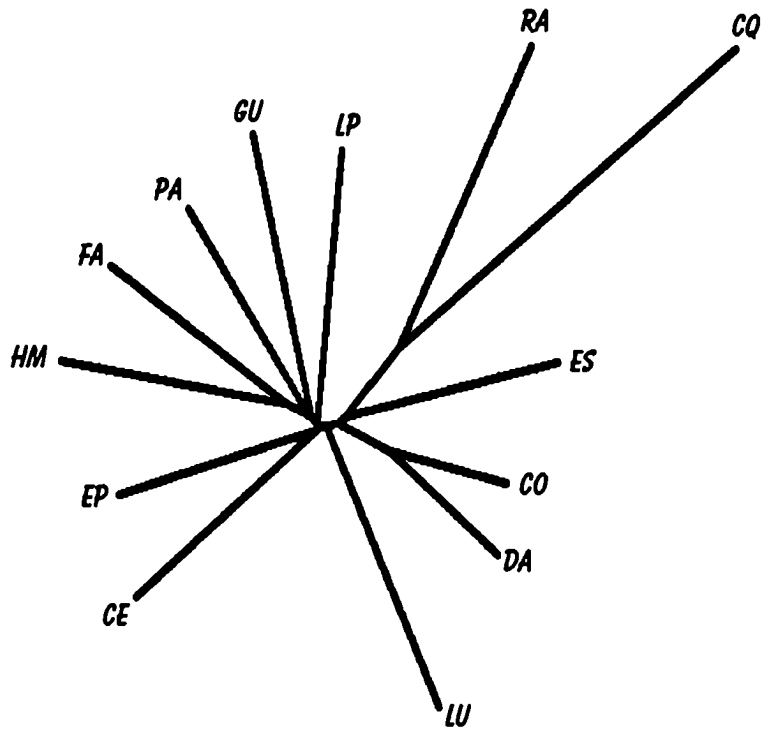

Fig. 12: Arbol de Neighbor-Joining obtenido a partir de las distancias de Lynch utilizando todas las enzimas (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Xba*I).

El árbol obtenido por el método de Neighbor-Joining basado en las distancias genéticas calculadas a partir de las distancias de Lynch considerando sólo presencia-ausencia se muestra en la figura 13. Dos agrupamientos principales sobresalen en el árbol. Por un lado, se agrupan juntas las poblaciones HM, FA, GU, PA, LP, EP y CE. Dentro de este grupo, HM y FA se ubican en el extremo del árbol levemente alejadas del resto. El otro grupo une a CO y DA, ambas muy cercanas a ES. Mientras que LU se ubica separada de estos dos grupos principales en una posición intermedia entre ellos. En el otro extremo del árbol se ubican las poblaciones del extremo oeste de Las Yungas (RA y CQ), siendo CQ la más diferenciada (Fig. 13).

Tabla 10: Distancias genéticas (Dij) de Lynch entre las poblaciones analizadas. El análisis se basó en las bandas compartidas (fragmentos de restricción para ADN ribosómicos) obtenidas de las digestiones con *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I y *Pst*I.

	HM	RA	CQ	FA	CE	EP	GU	PA	CO	DA	ES	LP	LU
HM		0.0327	0.1453	-0.0053	-0.0008	-0.0008	-0.0041	-0.0026	0.0312	0.0414	0.0209	-0.0049	0.0503
RA			0.0488	0.0391	0.0088	0.0124	0.0329	0.0234	0.0464	0.0338	0.0254	0.0159	0.0308
CQ				0.1535	0.1228	0.1295	0.1434	0.1265	0.0976	0.0753	0.0745	0.1271	0.1159
FA					0.0035	0.0012	-0.0013	-0.0009	0.0455	0.0531	0.0286	-0.0031	0.0544
CE						-0.0130	0.0002	-0.0064	0.0293	0.0204	0.0032	-0.0122	0.0171
EP							-0.0016	-0.0099	0.0311	0.0231	0.0099	-0.0156	0.0171
GU								-0.0036	0.0284	0.0347	0.0168	-0.0068	0.0454
PA									0.0209	0.0180	0.0033	-0.0146	0.0257
CO										-0.0087	-0.0025	0.0173	0.0572
DA											-0.0132	0.0137	0.0254
ES												0.0017	0.0237
LP													0.0208
LU													

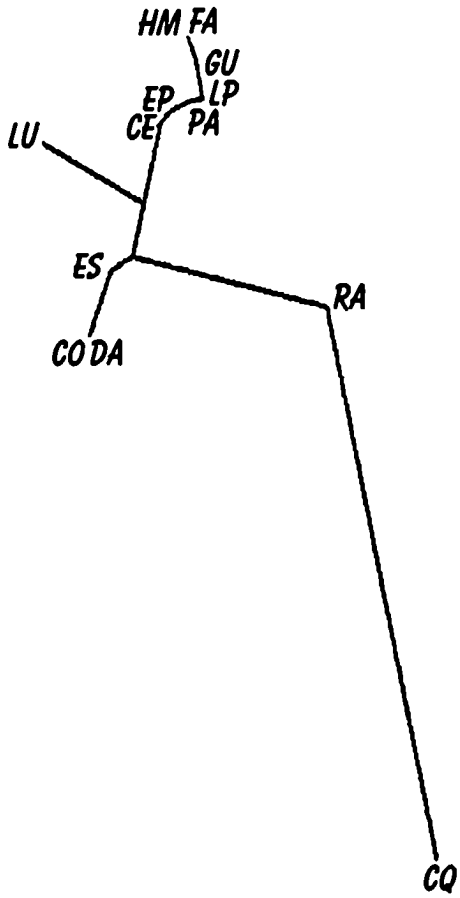

Fig. 13: Arbol obtenido por el método de Neighbor-Joining utilizando las distancias genéticas de Lynch.

Los fragmentos de restricción mostraron diferencias visibles en la intensidad de las bandas sugiriendo que dichos fragmentos podrían encontrarse en diferentes copias en las unidades repetidas. Por tal motivo se midió la intensidad de las bandas usando el programa Scion Image (Scion Corporation 1998) y se calculó nuevamente la variabilidad intra e interpoblacional empleando en este caso el índice de Hedrick.

Los valores de similitud (Si_h) dentro de las poblaciones oscilaron entre 0.409 y 0.667, donde los valores más bajos fueron para CQ y RA sugiriendo mayor variación intrapoblacional (Tabla 6). La distancia (Dij_h) entre las poblaciones varió entre 0.0317 para FA-HM y 0.4624 para FA-CQ (Tabla 11).

A partir de las distancias genéticas se construyó un dendrograma utilizando el método de Neighbor-Joining (Fig. 14). El árbol muestra una estructura similar al obtenido a partir de las distancias de Lynch, aunque se observaron ciertas discrepancias entre ellos al analizar las relaciones entre algunas poblaciones dentro de los agrupamientos principales. La evaluación de las intensidades de las bandas en la estimación de las distancias permite separar ciertas poblaciones que presentan las mismas bandas pero con distintas intensidades, tales son los casos de CO y DA o EP y CE (ver Fig. 13 y 14).

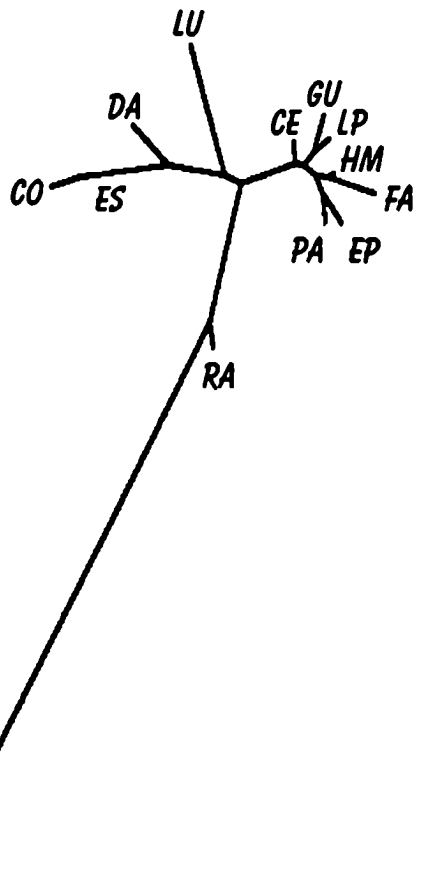

Fig. 14: Arbol obtenido por el método de Neighbor-Joining utilizando las distancias de Hedrick considerando las intensidades de las bandas.

Tabla 11: Distancias genéticas entre poblaciones calculadas a partir del índice de similitud de Hedrick utilizando los datos de intensidad de los fragmentos de restricción del ADN ribosómico para *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I y *Pst*I.

	HM	RA	CQ	FA	CE	EP	GU	PA	CO	DA	ES	LP	LU
HM		0.1091	0.4179	0.0317	0.0348	0.0485	0.034	0.044	0.1794	0.1398	0.1473	0.0412	0.1232
RA			0.289	0.1294	0.0997	0.1014	0.1378	0.0999	0.2711	0.2216	0.2072	0.1229	0.1806
CQ				0.4624	0.4108	0.4392	0.4469	0.4163	0.3274	0.3357	0.3295	0.435	0.4114
FA					0.0641	0.0452	0.0767	0.0524	0.2334	0.1491	0.1617	0.0668	0.1308
CE						0.0524	0.0385	0.0546	0.1439	0.1169	0.1	0.0301	0.1217
EP							0.0679	0.0299	0.2354	0.1426	0.1826	0.0606	0.1356
GU								0.0386	0.165	0.1506	0.1525	0.0294	0.1482
PA									0.2097	0.142	0.1632	0.0518	0.1426
CO										0.0887	0.0044	0.0753	0.1955
DA											0.0754	0.12	0.1048
ES												0.1311	0.1395
LP													0.1277
LU													

DISCUSION

Distribución de la variación del ADN ribosómico dentro y entre poblaciones en *Dichroplus elongatus*

Las múltiples copias de las familias multigénicas tales como el ADN ribosómico (ARNr) abren la posibilidad de encontrar variación tanto intra como interindividual (Avise 1994). La variabilidad intraindividual se relaciona con la heterogeneidad entre las diferentes variantes detectadas a través de variaciones en la longitud de los fragmentos de restricción. Estas copias heterogéneas pueden estar: a) localizadas en diferentes cromosomas homólogos (heterocigotas), b) asociadas a diferentes loci y c) presentes en el mismo locus (alelos compuestos). En cambio, la heterogeneidad interindividual genera variación dentro y entre las poblaciones.

Por lo tanto, los altos niveles de variación del ADNr han estimulado el interés en analizar tanto las fuerzas que generan esta variabilidad así como cuales de estas fuerzas afectan su distribución (Learn y Schaal 1987). Asimismo, el ADNr nuclear provee una alternativa al ADNmt para detectar variación tanto dentro como entre poblaciones debido a las diferencias en el modo de herencia.

Gracias a sus características pueden realizarse diferentes abordajes concernientes a la evolución de este sistema de genes. Cuando se analiza la variación genética dentro de especies, poblaciones o individuos, suele encontrarse homogeneidad entre las copias génicas del ADNr debido a los mecanismos de evolución concertada (Hillis y Dixon 1991). Sin embargo, el éxito del efecto de la evolución concertada dependerá del sistema de apareamiento y el contexto biológico de la especie (Dover 1982). Es decir, que la variabilidad del ADNr provee

información de la interacción entre los mecanismos de homogeneización y las fuerzas evolutivas que afectarían los niveles y distribución de la variación dentro de la especie (Sytsma y Schaal 1990).

La mayor diversidad en el ADNr se atribuye a la rápida evolución de una de las regiones de la unidad génica, el espaciador no transcripto NTS (Hillis y Dixon 1991). Así, la principal ventaja que ofrece el NTS sobre las otras regiones del genoma ribosómico es su alta tasa de evolución que permite abordar el análisis de las diferencias intra e interpoblacionales.

En el presente trabajo se evaluó la variación del NTS dentro y entre poblaciones naturales de *D. elongatus*.

Para todas las enzimas analizadas se observó la presencia de más de una banda sugiriendo variación intraindividual. Esta característica llevó a que no se pueda determinar un genotipo único por individuo. Asimismo, se observó variación dentro y entre poblaciones. Por lo tanto, el análisis poblacional se realizó en función de la presencia y ausencia de variantes. El grado de variación dependió de la enzima de restricción considerada. *Eco*RI fue la que presentó mayor variación. Se detectaron nueve diferentes fragmentos de restricción que, combinados, dieron origen a 54 patrones, donde más de la mitad sólo estuvo presente en un único individuo. Además, esta enzima mostró tanta variación intra como interpoblacional. Tal es el caso de CQ donde cada individuo presentó una variante diferente para *Eco*RI. Los tamaños de algunos de los fragmentos de restricción varían entre 100 a 700 pb sugiriendo la posibilidad de la presencia de subunidades repetidas en tándem más que la perdida o ganancia de un nuevo sitio. Las unidades de genes ribosómicos pueden ser homogeneizadas para una variante de largo particular por ciclos de entrecruzamiento desigual de la unidad repetida completa o por conversión génica.

En contraste, el entrecruzamiento desigual entre subunidades intergénicas en tándem (secuencias entre 100 y 300 pb) producen unidades repetidas de ADNr de diferente largo (Coen *et al.* 1982, Cluster *et al.* 1987, Rocheford *et al.* 1990). Nuestras observaciones sugieren que la variación en los tamaños de los fragmentos obtenidos con *Eco*RI podría reflejar la ocurrencia de entrecruzamiento desigual entre subunidades repetidas en tándem dentro del NTS. Sin embargo, en ausencia de secuenciación directa de la región no se puede descartar que la variación detectada para esta enzima se deba a una u otra causa.

Excepto *Eco*RI, el resto de las enzimas presentó un menor grado de variación intrapoblacional siendo más informativas a nivel interpoblacional. En particular, la enzima *Hin*dIII presentó fragmentos y patrones de restricción privados de CQ, mientras que los fragmentos y los patrones de restricción obtenidos a partir de las digestiones con *Pst*I y *Xba*I mostraron diferencias en la frecuencia de los mismos entre las poblaciones analizadas.

Como se mencionó previamente, los miembros de las familias multigénicas exhiben un alto grado de homogeneidad dentro de las especies. Esta homogeneidad es inconsistente con una hipótesis de evolución no independiente entre miembros que sería explicada a través de la existencia de evolución concertada. La conducción molecular es vista como un mecanismo que opera independientemente de las fuerzas evolutivas tradicionales. La tasa con la cual la conducción molecular homogeneiza una familia génica es teóricamente determinada por el tamaño de la familia, el tamaño efectivo poblacional, la tasa de mutación, la recombinación desigual y la conversión génica (Dover 1982). Sin embargo, bajo mecanismos moleculares de evolución concertada, la selección natural y la deriva genética pueden también actuar para mantener o eliminar la diversidad intraespecífica en las familias multigénicas.

Basados en este contexto teórico, se analizaron los resultados observados en *D. elongatus*. Si la evolución concertada constituye un mecanismo eficiente en esta especie, es de esperar que la mayoría de los individuos dentro de una población compartan un espaciador común. Es decir, que la variación debería ocurrir principalmente entre las poblaciones. Esto no ocurre en las poblaciones analizadas en este trabajo. Los índices de similitud evidenciaron una variabilidad intrapoblacional del 9.1% al 22.6% y del 33.4% al 59,1% para Lynch y Hedrick, respectivamente. Las poblaciones de RA y CQ presentaron los valores más altos. Asimismo, el número promedio de bandas difiere entre las provincias biogeográficas. Los valores más altos se detectaron en Las Yungas sugiriendo mayor diversidad genética intrapoblacional en comparación con las provincias Pampeana y Espinal.

Los resultados sugieren que mecanismos tales como selección natural, deriva genética, migración, mutación o recombinación desigual podrían estar actuando en las poblaciones y a escala molecular habrían generado una enorme cantidad de diversidad en los NTS dentro de las poblaciones contrarrestando el efecto de la evolución concertada. Resultados similares se encontraron en poblaciones de la especie de *Drosophila melanogaster* y *D. mercatorum* que mostraron un alto grado de polimorfismo para el número de copias y largo del NTS sugiriendo alta tasa de mutación y entrecruzamiento desigual entre cromátidas hermanas (Williams *et al.* 1985, 1987). Sin embargo, en poblaciones del mosquito *Aedes albopictus* (Black IV *et al.* 1989), mientras la mayoría de la diversidad en el NTS se manifestaba a escala poblacional, los individuos dentro de una población portaban un único tipo de espaciador, sugiriendo que la conducción molecular operaría en las poblaciones generando evolución concertada entre espaciadores.

En plantas, se han descripto algunos ejemplos donde la variación intra específica en el ADNr se asoció con características del sistema de apareamiento, el flujo génico efectivo entre las poblaciones y la deriva genética que opera entre ellas (Schaal *et al.* 1987, Sytsma y Schaal 1990 y Byrne *et al.* 1997). En este contexto es de importancia evaluar el aislamiento geográfico y genético entre las poblaciones.

En *D. elongatus* la hipótesis de un elevado flujo génico ente las poblaciones favoreciendo la homogeneización sería poco plausible. Tal es el caso de RA y CQ donde se encontraron diferencias en el ADNr en presencia de un sustancial flujo génico. En contraste, otras poblaciones distantes geográficamente, tal es el caso de CQ con CO y DA, presentan alta frecuencia del patrón A para la enzima *Xba*I que a su vez está poco presente en el resto de las poblaciones analizadas. Ciertas variantes del ADNr pueden tener alguna ventaja selectiva sobre otras por incrementar la eficiencia de la transcripción de los genes ribosómicos que estaría relacionada con la producción de ribosomas, la capacidad de traducción, la actividad enzimática, el metabolismo, el desarrollo y la adaptación.

En algunas especies de plantas, se detectó una asociación entre la diversidad en el ADNr y factores climáticos. En el trigo salvaje, se encontró que la diversidad en el ADNr se asociaba significativamente con la temperatura (Flavell *et al.* 1986). En *Macrozamia riedlei*, una planta australiana con fecundación cruzada, se evidenció que las poblaciones con mayor diversidad en el ADNr se localizaban en zonas con condiciones climáticas más favorables (Byrne *et al.* 1997). Asimismo, la diferenciación del ADNr en *Picea mariania* y *P. rubens* se atribuyó a la deriva genética y a la selección ecogeográfica (Bobola *et al.* 1992). En *D. elongatus*, las poblaciones con mayor número promedio de bandas por individuo y bandas o patrones privados son aquellas localizadas en la zona de mayor altitud (RA y CQ).

De hecho se observó una regresión significativa entre el número de bandas totales y algunas bandas polimórficas para *Hind*III, *Pst*I y *EcoR*I con esta variable geográfica. En nuestro caso, esta variable se corresponde con las temperaturas más bajas, con la mayor variación entre las temperaturas mínimas y máximas y con los veranos más cortos y los inviernos más largos, sugiriendo que esta especie puede constituir un nuevo ejemplo de variabilidad intraespecífica asociada a condiciones climáticas.

Comparación de los resultados obtenidos con el ADN ribosómico y el ADN mitocondrial en *Dichroplus elongatus*

El análisis de polimorfismos para segmentos de ADNmt y ADNr proporcionan marcadores útiles para evaluar la diferenciación entre las poblaciones. El análisis combinado de marcadores nucleares y citoplasmáticos provee mayor información sobre el tiempo de divergencia y los niveles de variación entre las poblaciones, así como la diversidad y la historia de las regiones nucleares y mitocondriales analizadas.

En el presente trabajo se utilizó al ADNr y al ADNmt como marcadores de la diferenciación genética dentro y entre poblaciones de *D. elongatus* con el objeto de brindar información sobre la evolución paralela de los distintos tipos de ADN analizando la importancia relativa de la migración y la deriva genética en la diferenciación intraespecífica.

El análisis del ADNmt mostró cierta relación entre el agrupamiento de las poblaciones y sus distribuciones biogeográficas. Sin embargo, dentro de la provincia Pampeana y Las Yungas se observó heterogeneidad en la distribución de los haplotipos mitocondriales sugiriendo restricciones en el flujo génico entre las poblaciones localizadas en zonas con diferentes condiciones ecológicas. Por lo tanto, los patrones de distribución del ADNmt en *D. elongatus* podrían explicarse por factores ecogeográficos.

Los dendrogramas obtenidos a partir de las distancias de Lynch (1990) y Hedrick (1983) para la región del NTS del ADNr muestran cierta concordancia entre sí pero discrepan bastante del fenograma obtenido empleando los datos del ADNmt.

Los árboles obtenidos por Neighbor-Joining empleando los patrones de distribución de los fragmentos de restricción para el ADNr no mostraron relaciones tan claras que puedan explicarse por factores ecológicos o geográficos. En ambos dendrogramas, CQ evidencia alta diferenciación genética con RA, la población con la que comparte similares condiciones ecológicas. En contraste, el resto de las poblaciones, que ocupan el extremo sudoeste de Las Yungas (HM y FA), presentan baja diferenciación genética con respecto a las poblaciones de la provincia Pampeana. Asimismo, dentro de la provincia Pampeana, las poblaciones de LU y LP que se agrupan juntas empleando los datos del ADNmt quedan separadas al evaluar las diferencias en el ADNr. Por último, en la provincia del Espinal se observa otra diferencia notoria, las poblaciones que se agrupan juntas con los datos mitocondriales se unen a diferentes grupos al considerar los datos ribosómicos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los factores ecológicos y geográficos no alcanzarían para explicar la distribución geográfica de los fragmentos de restricción para el ADNr a lo largo de las poblaciones analizadas como lo observado en la distribución de los haplotipos mitocondriales.

En contraste con estos resultados, en otros acrídidos, *Chorthippus parallelus* (Cooper y Hewitt 1993, Cooper *et al.* 1995, Lunt *et al.* 1998b), se observó que la diferenciación genética poblacional evidenciada a partir de los datos de una región del ADN nuclear y los datos del ADNmt era muy similar. Se encontraron grandes diferencias entre poblaciones relativamente cercanas pero separadas por los Pirineos (es el caso de las poblaciones de Francia y España) o por los Alpes (en el caso de las poblaciones de Francia e Italia). Simultáneamente, estas poblaciones francesas fueron más similares a poblaciones distantes localizadas en Rusia y Turquía. Los

patrones de distribución de ambos marcadores son explicados bajo la base de las rutas de colonización de esta especie después de la última glaciación.

Si bien las rutas de colonización de *D. elongatus* no son conocidas, hay algunas evidencias de que la colonización pudo haber sido de norte a sur (Cigliano comunicación personal). El hecho que las poblaciones de Las Yungas presenten mayor variabilidad sugiere que éstas pueden ser más antiguas acumulando mayor cantidad de mutaciones. Sin embargo, no se puede descartar que la variación detectada para el NTS no reflejaría lo esperado para un marcador neutro dada la correlación entre la variabilidad y la altitud y podría estar relacionada con alguna fuerza evolutiva dentro de la cual la selección por factores climáticos sería una posible explicación.

Capítulo VI:

Análisis de la variación del ADN mitocondrial en poblaciones naturales de *Eyprepocnemis plorans*

Antecedentes sobre *Eyprepocnemis plorans* y su complejo sistema de cromosomas B

El género *Eyprepocnemis* presenta una amplia distribución en Africa y en Asia tropical. En Europa, *E. plorans* es el único representante de este género y se localiza sobre la costa mediterránea de España, Italia y Grecia (Dirsh 1958). En la Península Ibérica, las poblaciones naturales de esta especie se extienden, a lo largo de 1000 km, desde Huelva hasta Tarragona (Fig. 15A). Aunque ciertas poblaciones aisladas se introducen en el continente solamente en zonas cercanas a los ríos Guadalquivir en Sevilla y Guadalhorce en la provincia de Málaga (Henriques-Gil y Arana 1990).

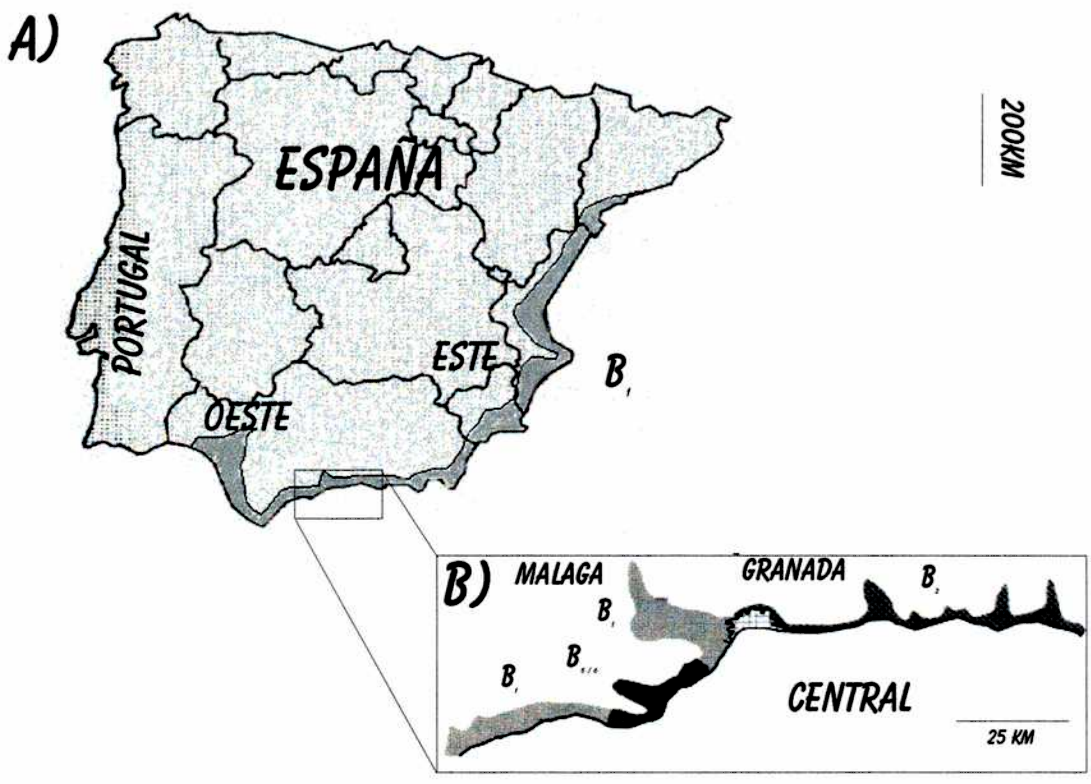

Fig. 15: A) El área sombreada describe la distribución de *Eyprepocnemis plorans* en la Península Ibérica. Las tres regiones (este, centro y oeste) se definieron de acuerdo a sus constituciones de cromosomas B. B) Distribución geográfica de las tres variantes principales de cromosomas B en el área central.

Esta especie ha despertado gran interés debido a que presenta un complejo sistema para cromosomas B. Los primeros registros sobre el polimorfismo para cromosomas accesorios en *E. plorans* describían dos tipos de B en algunas poblaciones de la provincia de Granada (Camacho *et al.* 1980). Posteriormente, nuevos datos revelaron un polimorfismo mucho más complejo describiéndose nuevas variantes de cromosomas B distinguibles por bandeo C (Henriques-Gil *et al.* 1982, Henriques-Gil *et al.* 1984). Los patrones de bandeo C indicaron un origen común para la mayoría de los tipos y un posible origen independiente para algunas pocas variantes de B secundarias.

Hoy se conocen más de 40 diferentes, pero interrelacionadas, variantes de cromosomas B en esta especie. De hecho, constantemente, nuevas formas se generan no solamente por recombinación sino también debido a una alta tasa de mutación. El origen *de novo* de variantes de cromosomas B en las poblaciones naturales de *E. plorans* se debería a mecanismos de misdivisión centromérica, inversiones, fusiones en tándem y deleciones (López-León *et al.* 1993). En los cruzamientos controlados se observaron embriones portadores de nuevas variantes de B que habían estado ausentes en los parentales. Además, las variantes originadas por traslocación mostraban una transmisión mendeliana mientras que las variantes originadas por deleciones mostraban una tendencia a la eliminación. Sin embargo, hasta el presente se desconoce cuáles son las causas por las que estas nuevas variantes de cromosomas accesorios no prosperan en las poblaciones y no consiguen desplazar o al menos igualar a las tres variantes principales (B_1, B_2 y B_5) (Fig. 16).

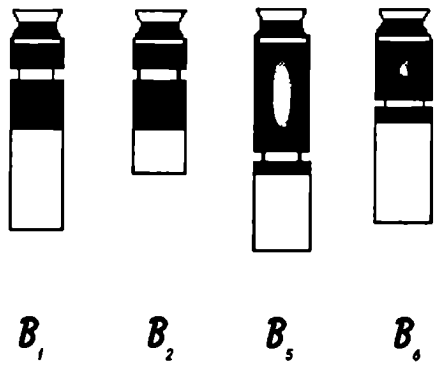

Fig. 16: Los cuatro tipos de cromosomas B más frecuentes detectados en *Eyprepocnemis plorans*.

En general, el mantenimiento de polimorfismos cromosómicos en las poblaciones suele ser explicado a través de modos de herencia no mendelianas que permiten el incremento de la frecuencia a lo largo de las generaciones en poblaciones con reproducción sexual. Contrariamente, *E. plorans* no parece ser uno de estos casos, dado que resultados previos indican que el comportamiento meiótico de estas tres variantes principales de Bs (B_1, B_2 y B_5) es consistente con un modo de herencia mendeliano. Además, el análisis de embriones en cruzamientos controlados indican que estos Bs son heredados de un modo regular sin tendencias a la acumulación o pérdida en ambos sexos (López-León *et al.* 1992a).

Aún no se han reunido evidencias para caracterizar a los cromosomas B de *E. plorans* como neutros, egoístas o heteróticos. O, mejor dicho, los cromosomas B de *E. plorans* pueden ser neutros, egoístas o heteróticos dependiendo del contexto genético en que se encuentran. Hembras provenientes de las poblaciones de Salobreña y Jete, donde el cromosoma tipo B_2 está reemplazando a la variante B_1,

portadoras de un B_1 y un B_2 mostraban una sobre transmisión de este último, mientras B1 tendía a la eliminación (López-León *et al.* 1992b). Individuos mantenidos en laboratorio en similares condiciones revelaron que el efecto sobre el incremento en la frecuencia de quiasmas se debería más al fondo genético que a los cromosomas B, sugiriendo una dependencia entre estos últimos y el genotipo básico (Henriques-Gil *et al.* 1982). En contraste, se describieron importantes diferencias en sus distribuciones geográficas (Henriques-Gil *et al.* 1984, López-León *et al.* 1992a). Las frecuencias más altas para cromosomas B se detectaron en poblaciones localizadas en lugares húmedos, mientras que poblaciones con climas más secos presentaban una baja frecuencia de individuos portadores (Henriques-Gil *et al.* 1984). Es decir, que en poblaciones que están expuestas a condiciones ambientales aparentemente desfavorables para *E. plorans* no se tolerarían altas frecuencias de cromosomas B (Henriques-Gil y Arana 1990). Empero, a lo largo de la cuenca del río Segura la distribución geográfica del polimorfismo para cromosomas B está principalmente explicado por eventos históricos no selectivos (Cabrero *et al.* 1997). Los resultados sugieren que los cromosomas B se incrementaron después de la primera colonización de *E. plorans* en la península Ibérica desde el norte de Africa. Los cromosomas B avanzaron a lo largo del río hasta alcanzar las barreras geográficas que impidieron que estos avanzaran preservándose la región sin Bs (Cabrero *et al.* 1997).

En España, la distribución geográfica de B_1, B_2 y B_5 se describe como sigue: B_1 es la variante más frecuente en las poblaciones localizadas en los extremos este y oeste del área de distribución de esta especie. A su vez, estas dos zonas están separadas por un área de 200km donde la forma B_1 está ausente y aparecen otras variantes. Esta área abarca las provincias de Granada y Málaga. El tipo B_2 es el

cromosoma supernumerario predominante en Granada y en el este de Málaga, mientras que un polimorfismo para las variantes $B_{5/6}$ aparece en alta frecuencia al oeste de la provincia de Málaga (Fig. 15B).

Basado en estos datos, se postuló que en la Península Ibérica, B_1 sería el cromosoma supernumerario ancestral y que B_2 y $B_{5/6}$ podrían haber derivado de éste desplazándolo gradualmente en el área central (Henriques-Gil y Arana 1990). Sin embargo, no existen explicaciones contundentes que puedan explicar este proceso de sustitución de un B por otro debido a la falta de efectos de los B (Camacho *et al.* 1997). Poblaciones de Guadalhorce, Fuengirola y Torrox mostraron diferencias comportamentales en el número de apareamientos y en el día promedio del primer apareamiento, pero en ninguno de los casos hubo relación con el número de cromosomas B existentes. La disparidad de resultados cuando se compararon las diferentes cajas de apareamiento sugiere diferentes efectos de los diferentes B o una interacción con el fondo genético que llevaría a la mejor tolerancia de los accesorios sobre ciertos genotipos (Martín *et al.* 1996). Sin embargo, encontrar un efecto negativo de los Bs no es una evidencia directa de parasitismo, dado que bajo este modelo una disminución de la aptitud de los portadores es contrarrestada por mecanismos de acumulación para los cromosomas B. Esto último no parece ocurrir en *E. plorans*.

Por lo tanto, Camacho *et al.* (1997) propusieron un modelo cercano a la neutralidad para el sistema de cromosomas B de esta especie. La coadaptación y la evolución de genes supresores en el complemento autosómico eliminarían los mecanismos de conducción de los B, por lo tanto el sistema alcanzaría un estatus cercano a la neutralidad hasta que una nueva variante recupere los mecanismos de acumulación y todo el proceso comience nuevamente.

Dado que los cromosomas B dependerían principalmente de una selección no fenotípica (Sapienza y Doolittle 1980), es decir que la evolución de los B se debería más a su tasa de transmisión que a sus efectos fenotípicos, uno podría preguntarse hasta que punto la evolución de los cromosomas accesorios es independiente de la evolución del genoma básico y plantear la posibilidad de que factores preexistentes en el genoma básico o un modelo de coadaptación podrían favorecer o desfavorecer el mantenimiento de un dado cromosoma B en las poblaciones. Por lo tanto, en *E. plorans* podría existir cierta diferenciación genética entre las regiones donde predominan diferentes variantes de B.

Objetivos

- Caracterizar la variabilidad del ADNmt en las poblaciones naturales de *Eyprepocnemis plorans* que presentan polimorfismos para las distintas variantes de cromosomas B.
- Obtener información acerca de la evolución paralela del ADNmt y los cromosomas B.

RESULTADOS

Distribución geográfica de *Eyprepocnemis plorans*

Se analizaron cromosómicamente un total de 252 individuos, de los cuales en 197 se analizó el ADN mitocondrial. Los individuos estudiados pertenecen a 12 poblaciones que abarcan el área definida por Henriques-Gil y Arana (1990). Se establecieron tres regiones de acuerdo al tipo de B presente en cada zona. 1) Región oeste B_1: Atalaya (AT) y Puerto Banús (PB); 2) Región B_5: Fuengirola (FG), Benalmádena (BM) y Arroyo de la Miel (AM); 3) Isla B1: Torremolinos (TM), Málaga (MA) y Estación Aljaima (EA); 4) Región B_2: Vélez-Málaga (VM) y Salobreña (SB); 5) Región este B_1: Arenales del Sol (AS) y Daimuz (DA) (Fig. 18).

Cromosomas B de *Eyprepocnemis plorans*

La tabla 12 muestra el número y los tipos de cromosomas B encontrados en los demos muestreados. B_1 estuvo presente en AT, PB, BM, AM, TM, MA, AS y DA, B_2 se encontró en VM y SB, mientras que B_5 y B_6 aparecieron en FG, BM, AM y MA. Por lo tanto, los resultados presentan una completa concordancia con las áreas definidas por Henriques-Gil y Arana (1990).

Tabla 12: Poblaciones analizadas, número de individuos con cada tipo de cromosoma B y morfos mitocondriales generados por *Eco*RI. B_5 coexiste en los mismos demos con otros tipos de B relacionados, por lo tanto se da el número total.

Demos	Análisis Citogenético				ADNmt			
	Total	N° de individuos con			Total	Morfos		
		B_1	B_2	B_5 o B_6		I	II	III
Atalaya (AT)	10	8			11	9	2	-
Puerto Banús (PB)	19	5			12	12	-	-
Fuengirola (FG)	18			15	14	14	-	-
Benalmádena (BM)	39	11	1	9	10	5	5	-
Arroyo de la Miel (AM)	11			3	10	7	3	-
Torremolinos (TM)	35	10	1		27	14	13	-
Málaga (MA)	12	4		1	10	-	10	-
Estación de Aljaima (EA)	13	4	2		13	-	13	-
Vélez Málaga (VM)	25		13		20		17	3
Salobreña (SB)	21		12		21	21	-	-
Arenales del Sol (AS)	25	5			25	25	-	-
Daimuz (DA)	24	11	-	-	24	19	5	-

ADN mitocondrial de *Eyprepocnemis plorans*

El ADN mitocondrial (ADNmt) de cada individuo se digirió con 9 enzimas de restricción detectándose un único patrón lo que sugiere la ausencia de heteroplasmia en esta especie. Asimismo, las bandas detectadas por electroforesis después de las digestiones indican un tamaño del genoma mitocondrial de aproximadamente 18.5 Kb.

Mientras que se detectaron diferencias en los patrones de restricción para *Eco*RI, el resto de las enzimas exhibieron el mismo patrón para todos los individuos analizados.

*Pst*I, *Kpn*I y *Xbo*I produjeron una única banda. Se obtuvieron dos fragmentos con *Bam*HI (11 + 7.6 kb) y *Ksp*I (17 + 1.7 kb). *Bgl*II y *Sac*I presentaron tres bandas de 15.7, 1.9 y 1 kb y de 9.8, 6.4 y 1.9 kb, respectivamente. *Hind*III fue la enzima que exhibió el mayor número de bandas (6.6a, 6.6b, 2a, 2b, 1.1 kb).

Los patrones mitocondriales detectados a partir de las digestiones con *Eco*RI dan origen a tres morfos que se diferencian por la presencia o ausencia de dos sitios de restricción. En otras palabras, mientras el morfo I muestra tres fragmentos de 10, 7.6 y 0.8 Kb, los morfos II y III presentan solamente dos fragmentos. La ausencia del sitio de restricción que involucra a las bandas de 10 y de 7.6 kb daría origen al morfo II, mientras que la pérdida del sitio que corresponde las bandas de 0.8 y 7.6 kb originaría al morfo III (Fig. 17).

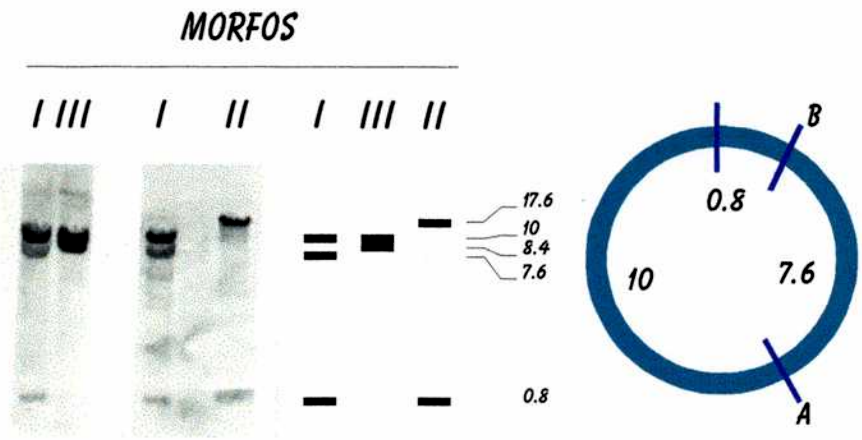

Fig. 17: Los diferentes morfos de ADNmt generados por las digestiones con *Eco*RI. Los fragmentos observados en los morfos II y III son el resultado de la ausencia de los sitios a y b respectivamente, que a su vez están presentes en el morfo I.

Distribución del ADN mitocondrial en *Eyprepocnemis plorans*

La frecuencia de cada uno de los morfos mitocondriales detectados en *E. plorans* se muestran en la tabla 12. El morfo I, es el más frecuente y ampliamente distribuido, es el único encontrado en las poblaciones de PB, FG, SB y AS. Mientras que el morfo II es exclusivo de las poblaciones de MA y EA. Además, las poblaciones de DA, AM, TM y AT comparten ambos morfos. El morfo III sólo se detectó en la población de VM (Fig. 18).

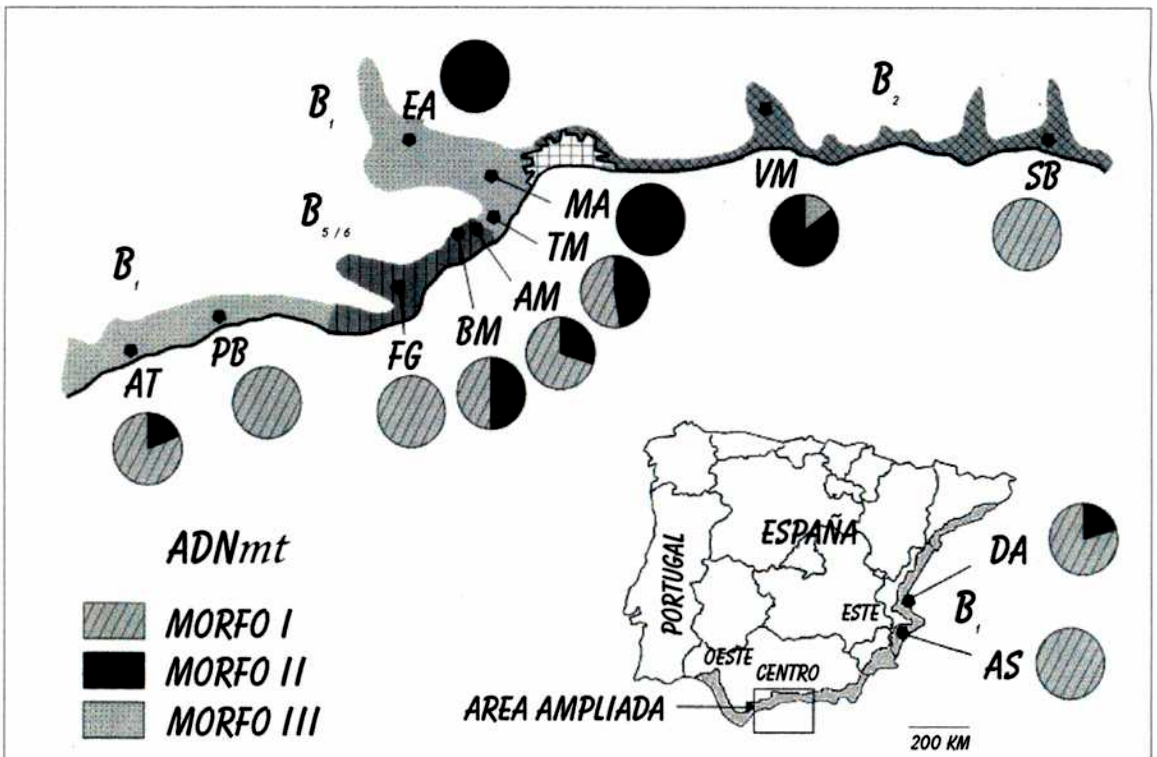

Fig. 18: Distribución geográfica de las tres variantes principales de cromosomas B y de los tres morfos mitocondriales detectados en los demos analizados. Los círculos indican la frecuencia de cada morfo mitocondrial en los diferentes demos. AT: Atalaya, PB: Puerto Banús, FG: Fuengirola, BM: Benalmádena, AM: Arroyo de la Miel, TM: Torremolinos, MA: Málaga, Estación Aljaima, VM: Vélez-Málaga, SB: Salobreña, AS: Arenales del Sol y DA: Daimuz.

DISCUSION

Cromosomas B y variación del ADN mitocondrial en *Eyprepocnemis plorans*

La diferenciación genética entre poblaciones coespecíficas puede deberse a la acción de diversos procesos evolutivos que pueden actuar de manera individual o conjunta. Factores tales como flujo génico, deriva genética, varios modos de selección natural, divergencia mutacional y oportunidad de recombinación génica explicarían la diferenciación de las poblaciones naturales (Avise 1994). Asimismo, los factores ecológicos e históricos contribuirían con la estructura poblacional.

E. plorans es un saltamontes ampliamente distribuido en la costa mediterránea en especial en España. El área analizada en este trabajo tiene unas dimensiones bastante reducidas (véase Fig. 15) y no presenta diferencias ambientales desde el punto de vista físico, climático y de vegetación. Por lo tanto, las barreras ecológicas no pueden explicar los diferentes morfos mitocondriales detectados en las poblaciones analizadas. Asimismo, no hay barreras geográficas que impidan el flujo génico entre poblaciones vecinas. Pero los demos son, en general, bastante reducidos e inmóviles por el desarrollo urbano de las últimas décadas; es importante también tener en cuenta que las variaciones en las precipitaciones anuales, propias del clima mediterráneo, provocan fuertes oscilaciones interanuales en los tamaños de las poblaciones. La deriva genética podría ser el principal componente que ha llevado a la diferenciación de estas poblaciones. El efecto de la deriva genética suele reflejarse en una menor variabilidad genética intrapoblacional que interpoblacional.

E. plorans muestra una escasa variabilidad intrapoblacional en lo que al ADNmt se refiere (aunque existen varios polimorfismos para segmentos heterocromáticos en varios cromosomas además de los propios accesorios; Henriques-Gil y Arana 1990). Sin embargo, los patrones detectados para *Eco*RI, pese al bajo número de sitios involucrados, no parecen un evento errático de origen múltiple dado que persisten en las poblaciones y la distribución geográfica de los mismos no se debe a un hecho azaroso que se esperaría por deriva genética. Por lo tanto, estos morfos podrían reflejar el modo de migración de esta especie a lo largo de esta área muestreada. Suponiendo que la pérdida de un sitio es un evento más parsimonioso que la ganancia de uno (Avise 1994), podríamos suponer que el morfo I es el más antiguo, y que los otros dos podrían haber derivado de éste o de algún otro originándose posteriormente. Si esto fuera así es claro que los eventos migratorios de esta especie estarían reflejados por la sustitución del morfo I por los morfo II y III.

A lo largo de 25 km, desde MA a FG, se observa un cambio en la distribución del morfo II y el morfo I con algunos demos polimórficos. Esto es especialmente importante si consideramos lo que sucede con los cromosomas B: la variante B_1 desde MA es reemplazado por los tipos $B_{5/6}$ en FG coexistiendo las tres variantes en la región intermedia. Simultáneamente, la distribución del ADNmt también muestra una zona híbrida entre estas dos poblaciones donde se observa la presencia del mofo I y II. Independientemente de cual morfo está siendo sustituido, la distribución del ADNmt refleja un movimiento de los morfos entre MA y FG que podrían o no acompañar el movimiento de los cromosomas B en esta zona (Fig. 18).

Fuera de esta área central el morfo I se extiende hacia el este de FG (región B_1), mientras que el morfo II es claramente dominante en la población de VM

(región B_2). Lo que sugiere que el morfo II se habría fijado más rápidamente por efecto de la deriva hacia este lado que hacia el otro lado de la distribución. Por otro lado, en SB (región B_2) y en AS (región B_1) el morfo I está ampliamente distribuido. Asimismo, es notorio el hecho que el morfo II aparece nuevamente coexistiendo con el morfo I en las dos poblaciones más extremas de este estudio (AT y DA). Por lo tanto, no se puede descartar que el morfo II pudiera constituir un relicto como los cromosomas tipo B1. En ese caso, ambos (B1 y morfo II) estarían siendo reemplazados por nuevas variantes cromosómicas y mitocondriales.

Capítulo VII:
Discusión Final

Aportes de los marcadores moleculares a la distribución de la heterocromatina supernumeraria en *Dichroplus elongatus* y *Eyprepocnemis plorans*

Los elementos heterocromáticos varían ampliamente en poblaciones naturales de animales y plantas. Algunas variantes heterocromáticas están integradas dentro del genoma como bandas C (Porter y Rayburn 1990), "knobs" (Longley 1938) o segmentos supernumerarios (Hewitt 1979, John 1983). Otra forma de heterocromatina supernumeraria está relacionada con la presencia de cromosomas B o supernumerarios. Generalmente, estos Bs exhiben mecanismos de acumulación los que involucran segregación preferencial en meiosis o no-disyunción en mitosis gametofítica con inclusión preferencial en las gametas funcionales, y menos frecuentemente, inestabilidad mitótica, fertilización preferencial y eliminación del genoma parental (Jones y Rees 1982, Beukeboom 1994). Asimismo, dado que los cromosomas B no producirían efectos fenotípicos adaptativos sobre los portadores y su principal actividad se relaciona con su transmisión han sido englobados dentro de las distintas formas del ADN egoísta (Matthews y Jones 1982).

Las formas heterocromáticas integradas al complemento normal ofrecen limitadas oportunidades para la segregación no mendeliana. Sin embargo, cuando diferentes formas de heterocromatina supernumeraria están presentes en la misma población pueden observarse interacciones entre ellas que podrían afectar los patrones de distribución de los diferentes tipos de heterocromatina supernumeraria (Rhoades y Dempsey 1973, López-León *et al.* 1991).

En el complejo sistema de cromosomas B detectado en *E. plorans* donde un tipo de B es sustituido por otro sin un aparente mecanismo de acumulación por

conducción meiótica (López-León *et al.* 1992), es necesario considerar otros factores tales como diferentes efectos en la aptitud de los portadores o una coadaptación entre genoma A y B. Camacho *et al.* (1997) desarrollaron la idea que ellos llamaron un cromosoma B cercano a la neutralidad debido a que no confieren ventajas ni desventajas a los portadores, no producen efectos exofenotípicos, no influyen sobre la frecuencia de quiasmas y no parecen afectar la fecundidad de las hembras. No obstante, algunos trabajos (Shaw *et al.* 1985, Nur y Brett 1987, 1988) indicaron la existencia de genes en el complemento A que podrían afectar la transmisión de los cromosomas B y serían responsables de las diferentes frecuencias de los accesorios en las poblaciones naturales. En tal caso, la coadaptación entre el genoma A y B llevaría a alguna diferenciación genética entre las poblaciones donde existen diferentes B. Asumiendo que la presencia de un determinado B es bastante estable, entonces la diferenciación de dos poblaciones con respecto a los genes coadaptados y directamente relacionados con el comportamiento de los B podría extenderse posteriormente a otros genes no relacionados localizados por ejemplo en el ADNmt. Realmente, si hay una diferenciación genómica cualquiera entre dos poblaciones, muchos marcadores no relacionados con la causa que determina esa diferencia, pueden igualmente variar por el mero hecho de haberse originado en poblaciones separadas y costarles pasar a las otras debido a limitaciones en el flujo génico. Esto podría estar pasando entre los cromosomas B y el ADNmt.

Bajo estas circunstancias, en *E. plorans*, la clina para los B desde FG a MA no involucra solamente a los cromosomas accesorios, sino también al complemento básico. Por consiguiente, la invasión de una región por un nuevo cromosoma accesorio podría ser un proceso lento dado que requiere de la sustitución de alelos en otros loci localizados en el genoma normal. Es difícil pensar que un tipo de B

estuviera directamente adaptado a un tipo de mitocondria. De hecho nosotros no encontramos una asociación directa entre un dado B con un dado morfo en un *determinado* individuo. En cambio, no es difícil pensar que la dinámica poblacional explicada por el ADNmt pueda ayudar a entender el complejo sistema de cromosomas B detectado en *E. plorans*.

En *D. elongatus* el mantenimiento de los cromosomas B también se encuentra bajo discusión aunque su mantenimiento en las poblaciones naturales parece apoyarse más sobre una hipótesis no neutralista debido a sus efectos sobre la fertilidad y la recombinación genética de los portadores. Por lo tanto, las evidencias obtenidas a partir de la distribución de las poblaciones de acuerdo a la variación en el ADNmt (un marcador supuestamente neutro) aportarían mayor información sobre el cómo y el por qué de la evolución de las distintas variantes heterocromáticas en esta especie.

Todas las poblaciones de *D. elongatus* analizadas en este el presente estudio, presentan polimorfismos para cromosomas B mitóticamente inestables y segmentos supernumerarios en los pares M6 (SS6), S9 (SS9) y S10 (SS10) (Loray *et al.* 1991, Clemente *et al.* 1994, Remis *et al.* 1998, Pensel *et al.* Manuscrito en preparación). Asimismo, todas las poblaciones presentan diferenciación cromosómica espacial y patrones de variación simultáneos para todas las variantes heterocromáticas (Remis *et al.* 1998, Pensel *et al.* Manuscrito en preparación).

En otros ortópteros, Marchant (1988) observó que los cambios en el ADNmt entre dos taxones del saltamontes *Caledia captiva* no coinciden con la zona híbrida definida por el genoma nuclear. Aparentemente ocurrió un evento de introgresión dentro de una zona híbrida que se mueve llevando detrás un nuevo tipo de ADNmt. Este evento involucraría la coadaptación del ADNmt al genoma nuclear. Asimismo,

las dos subespecies de *C. captiva* presentaron discrepancias entre el ADNmt y la estructura cromosómica (Marchant y Shaw 1993). Mientras una subespecie es conservativa en estructura cromosómica y presenta considerable variación geográfica del ADNmt, la otra muestra muy poca variación del ADNmt y concordante clina en la posición del centrómero para cada cromosoma.

Pese a que *E. plorans* y *D. elongatus* constituyen cada uno un único taxón y no hay evidencias de la existencia de razas dentro de los mismos ni eventos de introgresión, nosotros encontramos algunos paralelismos con *C. captiva*, a la vez que también se encontraron interesantes diferencias en el caso de *E. plorans*.

En *E. plorans* y de acuerdo con Henriques-Gil y Arana (1990), los demos cercanos a MA representan una reliquia de la amplia distribución del cromosoma B_1. Aunque, en esta "isla" podría haber una diferenciación genética a nivel del ADNmt con respecto a las poblaciones vecinas. El morfo II está ampliamente distribuido en esta zona y presenta una franja híbrida con el morfo I entre MA y FG. Si el flujo génico entre estas poblaciones fuera mayoritariamente unidireccional (de este a oeste), entonces el morfo II podría introducirse en nuevas poblaciones y mantenerse en ellas por efecto de la deriva genética. Bajo estas condiciones, los tipos $B_{5/6}$ avanzarían en sentido contrario y eso explicaría su imposibilidad de llegar a EA. En otras áreas, fuera del área central, no se detectaron cambios paralelos entre los patrones mitocondriales y los cromosomas B, ejemplo de estos son: FG - PB, donde comparten el mismo morfo pero se localizan en distintas áreas de distribución de los B; SB - VM, comparten la zona de B_2, pero presentan distintos patrones mitocondriales. Una explicación podría ser que tales poblaciones estén en un estado diferente del proceso evolutivo. Es decir, que nuevas variantes de cromosomas B se introducirían más rápidamente en otras poblaciones que lo que lo hacen las nuevas

variantes de ADNmt o viceversa. Otra explicación podría ser que el movimiento de los Bs en estas poblaciones no estuviera acompañado por el ADNmt similarmente a lo que ocurre en *C. captiva.*

Por el contrario, desde VM hacia FG, suponiendo que el morfo II estaría reemplazando al morfo I en esta área de la distribución, los movimientos delineados por el ADNmt podrían favorecer el movimiento de B_2, ampliamente distribuido en VM, explicando el hecho de que ya esté apareciendo en nuevas poblaciones como EA (reliquia B_1), TM y BM (franja híbrida B_1y $B_{5/6}$). Por lo tanto, el flujo génico esperado para los patrones mitocondriales podría acompañar, en el caso de B_2, el movimiento de sustitución de un B por otro.

En *D. elongatus* las diferencias entre la distribución del ADNmt y las variantes heterocromáticas son aún más marcadas. En particular, en seis de las poblaciones analizadas aquí, se observó diferenciación entre ellas para el SS6 y cromosomas B que podría relacionarse con la heterogeneidad entre las regiones principales (Noroeste y Este) y el aislamiento por distancia detectado para el ADNmt. En contraste, el SS10 no muestra diferencia entre las regiones principales, siendo destacable la diferenciación entre las poblaciones de la provincia biogeográfica de Las Yungas. Asimismo, se encontraron similares resultados para el SS9 (Remis *et al.* 1998). Por lo tanto, la diferenciación cromosómica detectada para el SS9 y el SS10 no puede explicarse sobre la base de los estudios filogeográficos realizados para el ADNmt.

Asimismo, en *D. elongatus*, la frecuencia de diferentes segmentos supernumerarios varía en función de la incidencia de los cromosomas B. La frecuencia del SS10 decrece y la incidencia de SS6 crece a medida que aumenta la frecuencia de los B (Remis *et al.* 1998). Bajo una hipótesis neutralista, la distribución

de las variantes heterocromáticas sería consecuencia de la interacción entre el flujo génico entre poblaciones y la deriva genética, que generaría diferencias entre poblaciones para las frecuencias de los cariomorfos. Sin embargo, en este caso esta explicación resulta poco convincente dado que poblaciones cromosómicamente homogéneas presentaron restricciones en el flujo génico estimado a partir de los datos mitocondriales reforzando la hipótesis de que la variabilidad cromosómica detectada en la especie no podría explicarse dentro de un marco puramente neutral. Por lo tanto, la interacción entre las diferentes formas de heterocromatina podría afectar los patrones de distribución esperados por azar y podría considerarse como un factor adicional involucrado en los patrones detectados en *D. elongatus*.

Asimismo, un análisis de componentes principales, que incorpora los datos de todas las variantes heterocromáticas, mostró que las poblaciones de *D. elongatus* no se agrupan de acuerdo con sus distancias geográficas (Remis *et al.* 1998). Al evaluar la forma de agrupamiento de las poblaciones a través de los datos ribosómicos se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, los resultados obtenidos basándose en datos cromosómicos y ADNr muestran ciertas discrepancias dentro de la provincia de Las Yungas. Según los datos cromosómicos, FA se aparta del resto de las poblaciones de dicha provincia, mientras que según los datos del ADNr, la población más alejada genéticamente dentro de esta provincia es CQ. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los factores que afectan la variación cromosómica y la del ADNr serían diferentes aunque en ambos casos podrían existir factores selectivos.

Por lo tanto, mientras que en *E. plorans* el área de distribución de los cromosomas B podría estar acompañada en algunos demos por los patrones de distribución de los morfos mitocondriales, en *D. elongatus* la distribución de las

diferentes formas heterocromáticas no pueden explicarse por la variación detectada en el ADNmt y el ADNr.

Bibliografía

PRINCIPALES CONCLUSIONES

☺ El patrón de distribución geográfico del ADNmt y el grado de heterogeneidad entre los haplotipos mitocondriales de *D. elongatus* en las poblaciones cercanas geográficamente, sugiere que el flujo génico debido a la fragmentación ambiental, podría reducir la oportunidad de migración entre las poblaciones vecinas geográficamente.

☺ Los patrones de distribución de la variación del ADNmt detectado en las poblaciones estudiadas en *D. elongatus* podrían explicarse por aislamiento por distancia entre las principales provincias biogeográficas (Las Yungas, Espinal y Pampeana) y dentro de las provincias de Las Yungas y Pampeana, factores ecológicos podrían haber contribuido a la diferenciación genética entre las poblaciones.

☺ La variación intraindividual y poblacional detectada en el ADNr de *D. elongatus* sugiere que mecanismos tales como selección natural, mutación o recombinación desigual podrían actuar en las poblaciones generando una enorme cantidad de diversidad en los NTS, contra restando el efecto de la evolución concertada.

☺ Los patrones de distribución detectados para el ADNr en *D. elongatus* sugieren que la variación detectada no reflejaría lo esperado para un marcador neutro y podría estar relacionada con alguna fuerza evolutiva dentro de la cual la selección por factores climáticos sería una posible explicación.

☺ En *E. plorans*, dentro del área central, el morfo II es mayoritario y se observa una zona híbrida tanto para cromosomas B como para ADNmt. La distribución del ADNmt refleja un movimiento de los morfos que podría o no acompañar el movimiento de los cromosomas B en esta zona.

☺ Fuera del área central el morfo I es mayoritario y no se detectaron cambios paralelos entre los patrones mitocondriales y los cromosomas B.

☺ Las poblaciones de *E. plorans* podrían estar en un estado diferente del proceso evolutivo. Es decir, que nuevas variantes de cromosomas B se introducirían más rápidamente en otras poblaciones que lo que lo hacen las nuevas variantes de ADNmt o viceversa. Sin embargo, no puede descartarse que el movimiento de los Bs en esta especie no sea acompañado por el ADNmt siendo interesante mirar otros marcadores.

☺ En contraste, en *D. elongatus* los patrones de flujo génico esperados a través de ADN mitocondrial no podrían explicar la diferenciación cromosómica detectada reforzando la hipótesis de que la interacción entre las diferentes formas de heterocromatina podría afectar los patrones de distribución esperados por azar y podría considerarse como un factor adicional involucrado en los patrones cromosómicos detectados.

Bibliografía

Allard, M. y Honeycutt, R. 1991. Ribosomal DAN variation within and between species of rodents, with emphasis on the genus *Onychomys*. Mol. Biol. Evol. 8: 71-84.

Apostolidis, A. P., Karakousis, Y. y Triantaphyllidis, C. 1996. Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Salmo trutta* L. (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. Heredity, 77: 608-618.

Arnheim, N., Krystal, M., Schmickel, R., Wilson, G., Ryder, O. y Zimmer, E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and ape. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7323-7327.

Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. 38-61. En Nei, M. y Koehn, R. K. Eds. Evolution of genes and proteins, Sinauer, Sunderland, Mass.

Arnheim, N., Treco, D., Taylor, B. y Eicher, E. 1982. Distribution of ribosomal gene length variants among mouse chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 4677-4680.

Arnold, M. L. Shaw, D. D, y Contreras, N. 1987. Ribosomal RNA- encoding DNA introgression across a narrow hybrid zone between two subspecies of grasshopper. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3946-3950.

Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall.

Avise, J. C. 1996. Three fundamental contributions of molecular genetics to avian ecology and evolution. IBIS, 138: 16-25.

Avise, J. C. y Nelson, W. S. 1989. Molecular genetics relationship of the extinctusly seaside sparrow. Science, 243: 646-648.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. y Saunders, N. C. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 489-522.

Beukeboom, L. W. 1994. Bewildering B's: an impression of the 1st B-chromosome conference. Heredity. 73: 328-336.

Black, W. C., Mclain, D. K. y Rai, K. S. 1989. Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). Genetics, 121: 539-550.

Bobola, M. S., Eckhert, R. T. y Klein, A. S. 1992. Restriction fragment variation in the nuclear ribosomal DNA repeat unit within and between *Picea rubens* and *Picea mariana*. Can. J. Forest Res. 22: 255-263.

Byrne, M., Waycott, M., Hobbs, A. A. y James, S. H. 1997. Variation in ribosomal DNA within and between populations of *Isotoma petraea* and *Macrozamia riedlei*. Heredity, 79: 578-583.

Cabrera, A. L. y Willink, A. 1980. Biogeografía de América Latina. Monografías Científicas de la OEA. Buenos Aires, Argentina, 13: 122.

Cabrero, J., López-León, J., Gómez, R., Castro, A. J. Martin-Alganza, A y Camacho, J. P. M. 1997. Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* along a river basin is mainly shaped by non-selective historical events. Chromosome Research, 5: 194-198.

Camacho, J. P. M., Carballo, A. R. y Cabrero, J. 1980. The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *plorans* (Charpentier). Chromosoma, 80: 163-176.

Camacho, J. P. M., Cabrero, J., López-León, M. A. y Shaw, M. W. 1997. Evolution of a near-neutral B chromosome. En: Henriques-Gil, N., Parker, J. S. y Puertas, M. J. (eds.). Chromosomes Today, 12: 301-319. Chapman y Hall.

Chapco, W., Kelln, R. A. y Mcfadyen, D. A. 1992. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Heredity, 69: 547-557.

Chapco, W., Kelln, R. A. y Mcfadyen, D. A. 1994. Mitochondrial DNA variation in North American melanopline grasshoppers. Heredity, 72: 1-9.

Cigliano, M. M., Wysiecki, M. L. y Lange, C. E. 1995. Disminución de la abundancia de *Dichroplus maculipenis* (Orthoptera: Acrididae) en comunidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Soc. Entomol. Argent. 54: 41-42.

Clemente, M., Remis, M. I. y Vilardi, J. C. 1994. Supernumerary heterochromatin, chiasma conditions and abnormal sperm formation in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera): intra and interpopulation analysis. Caryologia, 47: 265-279.

Clemente, M., Remis, M. I. y Vilardi, J. C. 1996. Spontaneous centric fusions affecting chiasma conditions in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera). Cytologia, 61: 155-162.

Coen, E. S., Strachen, T. y Dover, G. A. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Biol. 158: 17-35.

Confalonieri, V. 1988. Effects of centric-shift polymorphisms on chiasma conditions in *Trimerotropis pallidipennis* (Oedipodinae: Acrididae). Genetica, 76: 171-180.

Confalonieri, V., Sequeira, A., Todaro, L. y Vilardi, J. C. 1998. Mitochondrial DNA and phylogeography of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. Heredity, 80: 444-452.

Cooper, S. J. B. y Hewitt, G. M. 1993. Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. Insect Mol. Biol. 2: 185-194.

Cooper, S. J. B., Ibrahim, K. M. y Hewitt, G. M. 1995. Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. Mol. Ecol. 4: 49-60.

Cluster, P. D., Marinkovic, D., Allard, R. W. y Ayala, F. J. 1987. Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes and adaptation in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 610-614.

Dirsh, V. M. 1958. Revision of the genus *Eyprepocnemis* Fieber. 1893. (Orthoptera: Acridoidea). Proc. R. Ent. Soc. London B. 27: 33-45.

Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature, 299: 111-117.

Echeverría, M., Penon, P y Delseny, M. 1994. Plant ribosomal DNA external spacer binding factors: a novel protein binds specifically to a sequence close to the primary pre-rRNA-processing site. Mol. Gen. Genet. 243: 442-452.

Flavell, R. B., O'Dell, M., Sharp, P., Nevo, E. y Beiles, A. 1986. Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dioccoides*, in Israel. Mol. Biol. Evol., 3: 547-558.

Felsenstein, J. 1992. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.4. Department of Genetics, Sk-50. University of Washington, Seattle, WA.

Halliburton, R. y Baker, J. S. F. 1993. Lack of mitochondrial DNA variation in Australian *Drosophila buzzatii*. Mol. Biol. Evol. 10: 484-487.

Harrison, R. G., R y , D. M. y Wheeler, W. C. 1987. Mitochondrial DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone. Mol. Biol. Evol. 4: 144-158.

Harrison, R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. Oxford Surv. Evol. Biol. 7: 69-128.

Hedrick, P. W. 1983. Genetics of Population. Science Books International. Pag: 73-74.

Henriques-Gil, N., Santos, J. L. y Giraldez, R. 1982. Genotype-dependent effect of B-chromosomes on quiasma frequency in *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae: Orthoptera). Genetica, 59: 223-227.

Henriques-Gil, N, Santos, J. L. y Arana, P. 1984. Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosoma, 89: 290-293.

Henriques-Gil, N. y Arana, P. 1990. Origin and substitution of B-chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Evolution, 44: 747-753.

Hewitt, G. M. 1979. Animal cytogenetics. Vol. 3: Insecta 1. Gebrüder Borntraeger Berlin. Stuttgart.

Hewitt, G. M. 1988. Hybrid zones- natural laboratories for evolutionary studies. Trends Ecol. Evol. 3: 158-167.

Hillis, M. D. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18: 23-42.

Hillis, D. M. y Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology, 66: 411-453.

Hillis, D. M., Moritz, C., Porter, C. A. y Baker, R. J. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. Science, 251: 308-310.

John, B. 1983. The role of chromosome change in the evolution of orthopteroid insects. En Chromosomes in evolution of eukaryotic groups. Vol. 1. Editado por: Sharman & Sharman Press. 1-114.

Jones, R. N. y Rees, H. 1982. B-chromosomes. Academic Press.

Kessler, C. 1987. Class II restriction endonucleases. En Cytogenetics, Obe, G. y Basler A. (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 225-279.

Kessler, L. G. y Avise, J. C. 1984. Systematic relationships among water fowl (Anatidae) inferred from restriction endonucleases analysis of mitochondrial DNA. Syst. Zool. 33: 370-380.

King, L. M. y Schaal, B. 1989. Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. Evolution, 43: 1117-1119.

Learn, G. H. y Schaal, B. A. 1987. Population subdivision for ribosomal DNA repeats variants in *Clematis fremontii*. Evolution, 41: 433-438.

Liberman, J. 1944. Los acridoideos de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 48: 3-158.

Linn, S. y Arber, W. 1968. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 59: 1300-6

Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. Mol. Biol. Evol. 7: 478-484.

Longley, A. E. 1938. Chromosomes of maize from North American Indians. J. Agric. Res. 56: 177-195.

López-León, M. D., Cabrero, J. y Camacho, J. P. M. 1991. Meiotic drive against an autosomal supernumerary segment promoted by the presence of a B chromosome in females of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Chromosoma. 100: 282-287.

López-León, M. D., Cabrero, J., Camacho, J. P. M., Cano, M. I. y Santos, J. L. 1992a. A widespread B chromosome polymorphism maintained without apparent drive. Evolution, 46: 529-539.

López-León, M. D., Pardo, M. C., Cabrero, J. y Camacho, J. P. M. 1992b. Random mating and absence of sexual selection for B chromosomes in two natural populations of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Heredity 69: 558-561.

López-León, M. D., Cabrero, J., Pardo, M. C., Viseras, E., Camacho, J. P. M. y Santos J. L. 1993. Generating high variability of B chromosomes in *Eyprepocnemis plorans* (Grasshopper). Heredity, 71: 352-362.

Loray, M. A., Remis, M. I. y Vilardi, J. C. 1991. Parallel polymorphism for supernumerary heterochromatin in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera): effects on recombination and fertility. Genetica, 84: 155-163.

Lunt, D. H. y Hyman, B. C. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. Nature. 387: 247.

Lunt, D. H. Whipple, L. E. y Hyman, B. C. 1998a. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. Mol. Ecol. 7: 1441-1455.

Lunt, D. H., Ibrahim, K. M., Hewitt, G. M. 1998b. Mitochondrial DNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. Heredity 80: 633-641.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Publications, Cold Spring Harbor.

Mantel, N. A. 1967. The detection of distance clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.

Marchant, A. D. 1988. Apparent introgression of mitochondrial DNA across a narrow hybrid zone in the *Caledia captiva* species-complex. Heredity, 60, 39-46.

Marchant, A. D. y Shaw, D. D. 1993. Contrasting patterns of geographic variation shown by mtDNA and karyotype organization in two subspecies of *Caledia captiva* (Orthoptera). Mol. Biol. Evol. 10: 855-872.

Martel, R. K. B. y Chapco, W. 1995. Mitochondrial DNA variation in North American Oedipodinae. Biochem. Genet. 33: 1-11.

Martin, S., Arana, P. y Henriques-Gil, N. 1996. The effect of B chromosomes on mating success of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Genetica. 97: 197-203.

Matthews, R. B. y Jones, J. N. 1982. Dynamics of the B chromosome polymorphism in rye. I. Simulated populations. Heredity 48: 347-371.

McElroy, D.; Moran, P.; Bermingham, E. y Kornfield, I. 1991. REAP (Restriction Enzyme Analysis Package) version 4.0. University of Maine, Orono, Maine.

Meselson, M. y Yuan, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. Nature. 23 1110-4.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Nei, M y Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics, 97, 145-163.

Nei, M. y Tajima, F. 1983. Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. Genetics, 105, 207-217.

Nur, U. y Brett, B. L. H. 1987. Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug, *Pseudococcus affinis* (*obscurus*). Genetics. 115: 499-510.

Nur, U. y Brett, B. L. H. 1988. Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealybug *Pseudococcus affinis*. Chromosoma. 96: 205-212.

Patterson, C. 1987. Molecules and Morphology in evolution: conflict or compromise? Cambridge University Press, Cambridge.

Polanco, C. y Perez De La Vega, M. 1997. Intergenetic ribosomal spacer variability in hexaploid oat cultivates and landraces. Heredity, 78: 115-123.

Porter, H. L. y Rayburn, L. 1990. B-chromosomes and C-band heterochromatin variation in Arizona maize populations adapted to different altitudes in Arizona maize populations adapted to different altitudes. Genome. 33: 659-662.

Randi, E., Francisci, F. y Luchini, V. 1995. Mitochondrial DNA restriction-fragment- length monomorphism in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. J. Zool. Syst. Evol. 33: 97-100.

Remis, M. I. 1990. Cytogenetic studies in *Sinipta dalmani* Stal (Orthoptera: Acrididae). II. Effects of centric fusions on chiasma frequency and distribution. Gen. Sel. Evol. 22: 263:272.

Remis, M. I. y Vilardi, J. C. 1986. Meiotic behavior and dosage effect of B chromosomes on recombination in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae). Caryologia, 39: 287-301.

Remis, M. I., Clemente, M., Pensel, S. y Vilardi, J. C. 1998. Non random distribution patterns of supernumerary segments and B chromosomes in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera). Hereditas, 129: 207-213.

Rhoades, M. M. y Dempsey, E. 1973. Chromatin elimination induced by the B chromosomes of maize. Heredity. 64: 13-18.

Rocheford, T. R., Osterman, J. C. y Gadner, C. OO. 1990. Variation in the ribosomal DNA intergenic spacer of a maize population mass-selected for high grain yield. Theor. Appl. Genet. 79: 793-800

Roff, D. A. y Bentzen, P. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: χ^2 and the problem of small samples. Mol. Biol. Evol. 6: 539-545.

Rogers, S. O. y Bendich, A. J. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. Plant Mol. Biol. 9: 509-520.

Ronderos, R. A. 1985. Consideraciones sobre la biogeografía de los melanoplinae en Sudamérica (Orthoptera: Acrididae). En Proc. 3rd Triennial meeting Pan American Acridid Society.

Rossi, M. S., Barrio, E., Latorre, A., Quezada-Díaz, J. E., Hasson Esteban., Moya, A. y Fontdevila, A. 1996. The evolutionary history of *Drosophila buzzatti.* XXX. Mitochondrial DNA polymorphism in original and colonizing populations. Mol. Biol. Evol. 13: 314-323.

Sáez, F. A. y Perez-Mosquera, G. 1971. Citogenética del género *Dichroplus* (Orthoptera: Acrididae). En "Recientes Adelantos en Biología". Mejia, R. y Moguilevsky (eds.), pp: 110-120. Buenos Aires.

Sapienza, C. y Doolittle, W. F. 1980. Genes are thing you have whether you want them or not. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 45, 177-182.

Schaal, B. A., Leverich, W. J. y Neito-Sotelo, J. 1987. Ribosomal DNA variation in the native plant *Phlox divaricata.* Mol. Biol. Evol. 4: 611-621.

Seperack, P., Slatkin, M. y Arnheim, N. 1988. Linkage disequilibrium in human ribosomal genes: implications for multigene family evolution. Genetics, 119: 943-949.

Sequeira, A., Confalonieri, V., Remis, M. I. y Vilardi, J. C. 1995. B chromosome and enzyme polymorphisms in the grasshopper Dichroplus elongatus: geographic gradients that are not explained by historical factors. Evolución Biológica, 8y9: 283-299.

Sequeira, A. 1996. Genética-poblacional y sistemática del género Dichroplus (Orthoptera: Acrididae): análisis de polimorfismos enzimáticos y de ADNmt. Tesis Doctoral. Dpto. de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Sequeira, A. S., Confalonieri, V. A. y Vilardi, J. C. 1997. An adaptive explanation for geographically structured allozyme variation in *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae). J. Genet. 76: 33-42.

Seutin, G., Ratcliffe, L. M. y Boag, P. T. 1995. Mitochondrial DNA homogeneity in the phenotypically diverse redpoll finch complex (Aves: Carduelinae: *Carduelis flammea-hornemanni*). Evolution, 49: 962-973.

Shaw, M. W., Hewitt, G. M. y Anderson, D. A. 1985. Polymorphism in the rates of meiotic drive acting on the B chromosome of *Myrmeleotettix maculatus*. Heredity, 54: 187-194.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-17.

Statistica Statosoft Inc. 1993. Statistica version 4.5. Tulsa, OK.

Sytsma, K. J. y Schaal, B. A. 1990. Ribosomal DNA variation within and among individuals of *Lisianthius* (Gentianaceae) populations. Pl. Syst. Evol. 170: 97-106.

Templeton, A. R., Routman, E. y Phillips, A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographic distribution of mtDNA haplotypes in the *Tiger salamander*, *Ambystoma tigrinum*. Genetics, 149: 767-782.

Vazquez, P., Cooper, S. J. B. Gosalvez, J. y Hewitt G. M. 1994. Nuclear DNA introgression across a Pyrenean hybrid zone between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*. Heredity, 73: 436-443.

Vilardi, J. C. 1985. Meiotic behavior in a population of *Dichroplus elongatus* (Orthoptera: Acrididae). Caryologia, 38: 147-160.

Vilardi, J. C. 1988. Studies on chiasma distribution on chiasma movement in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). Genetica, 76: 73-80.

Wallis, G. P. 1999. Do animal mitochondrial genomes recombine? Trends Ecol. Evol. 4: 209-210.

Williams, S. M., DeSalle, R. y Strobeck, C. 1985. Homogenization of geographical variants at the nontranscribed spacer of rDNA in *Drosophila mercatorum*. Mol. Biol. Evol. 2: 338-346.

Williams, S. M., Furnier, G. R., Fuog, E. y Strobeck, C. 1987. Evolution of the ribosomal DNA spacers in Drosophila melanogaster: different patterns of variation on X and Y-chromosomes. Genetics, 116: 225-232.

Williams, S. M., Debry, R. W. y Feder, J. L. 1988. A commentary on the use of ribosomal DNA in systematic studies. Syst. Zool. 37: 60-62.

Wilson, G. N., Knoller, M. y Szura, L. L. 1984. Individual and evolutionary variation of primate ribosomal DNA transcription inition regions. Mol. Biol. Evol. 1: 221-237.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.

Zapata, S. 1987. Food habits of *Dichroplus elongatus* gioglio-tos (Orthoptera: Acrididae: Cantantopinae). Acta Entomológica Chilena, 14: 59-64.

Zink, R. M. 1996. Comparative phylogeography in North American birds. Evolution, 50: 308-317.